

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1929-1930

N° 9

SUR LES FLORES BACTÉRIENNE
ET FONGIQUE
DES CAILLÉS DE LAIT

RÔLE DES SYMBIOSES
DANS LA MATURATION DU CAMEMBERT

THÈSE

pour l'obtention du Diplôme de Docteur de l'Université de Paris (Pharmacie)

présentée et soutenue le

1930

PAR

Françoise SANSONETTI

Pharmacien

JURY

{ MM. RADAIS, *Président.*
LUTZ, *Professeur.*
BACH, *Agrégé*

PARIS

LIBRAIRIE LOUIS ARNETTE

2, RUE CASIMIR-DELAVIGNE, 2

1930

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1929-1930

N° 9

SUR LES FLORES BACTÉRIENNE
ET FONGIQUE
DES CAILLÉS DE LAIT



RÔLE DES SYMBIOSES
DANS LA MATURATION DU CAMEMBERT

THÈSE

pour l'obtention du Diplôme de Docteur de l'Université de Paris (Pharmacie)

présentée et soutenue le

1930

PAR

Françoise SANSONETTI

Pharmacien

JURY

MM. RADAIS, *Président.*
LUTZ, *Professeur.*
BACH, *Agrégé*

PARIS

LIBRAIRIE LOUIS ARNETTE

2, RUE CASIMIR-DELAVIGNE, 2

1930

Personnel de la Faculté de Pharmacie

ADMINISTRATION

MM. RADAIS, *Doyen*, O., ,  I.
PERROT, *Assesseur*, O., ,  I.
G. DURSENT, *Secrétaire*, ,  I.

PROFESSEURS

MM. DAMIENS, ,  I Chimie minérale.
RADAIS, O., ,  I Cryptogamie et Microbiologie.
BÉHAL, Membre de l'Institut, G. O., ,  I.. Chimie organique.
PERROT, O., ,  I Histoire naturelle des Médicaments.
COUTIERE, O., ,  I Zoologie.
GRIMBERT, ,  I Chimie biologique.
LEBEAU, O., ,  I Pharmacie chimique.
DEI ÉPINE, O., ,  I Hydrologie et Hygiène.
GUERBET, ,  I Toxicologie.
BOUGAULT, ,  I, Chimie analytique.
GORIS, ,  I Pharmacie galénique.
GUERIN, ,  I Botanique Générale.
TASSILLY, ,  I Physique.

Professeur honoraire : M. A. VILLIERS, ,  I.

CHARGÉS DE COURS

MM. SOMMELET, ,  I Minéralogie.
MARC HONNORAT, ,  I. Législation et Déontologie pharmaceutiques
LUTZ, ,  I Cryptogamie.

AGRÉGÉS EN EXERCICE

MM. SOMMELET,  ,  I.	MM. PICON,  I.
LUTZ,  ,  I.	FABRE,  A.
LAUNOY, O.,  ,  A.	MASCRÉ,  I.
HÉRISSEY, O.,  ,  I.	FLEURY,  I.
DELABY,  ,  A.	BACH,  I.

CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES

MM. DEFACQZ, ,  I Chimie générale.
FABRE,  A. et FLEURY,  I. : agrégés,
chargés des travaux de Chimie analytique.
SOUÈGES,  I Micrographie.
LEROUX,  I Physique.
DEVAL,  I Microbiologie.
HÉRISSEY, O., ,  I... }
DELABY, ,  A. }
PICON,  I. } Agrégés chargés des
travaux généraux de 4^e année

Bibliothécaire en chef : M. BEAULIEUX,  I.

A LA MÉMOIRE DE MON GRAND-PÈRE

CH.-J. ORSINI

A LA MÉMOIRE DE MON ONCLE

PH.-M. SANSONETTI

A MON PÈRE ET A MA MÈRE

A MA SŒUR

A MON FRÈRE

A MES AMIS

A M. le Professeur RADAIS

Doyen de la Faculté de Pharmacie

Hommage de respectueuse reconnaissance.

A M. le Professeur TEISSIER

Membre de l'Académie de Médecine

et à M. le Professeur agrégé GASTINEL

*Hommage de vive reconnaissance et de
respectueuse admiration.*

INTRODUCTION

Au moment des découvertes pastoriennes sur l'origine vitale des fermentations, les connaissances sur le lait étaient d'ordre purement chimique. Les méthodes analytiques avaient permis de séparer et de doser ses principaux constituants. En 1840, Quévègne isolait la caséine ; Mulder, Denis, Lieberkühn, Millon et Commaille, Hammarsten cherchaient à en préciser la nature et les propriétés chimiques. Chevreuil et Bromeis s'efforçaient de fixer la composition du beurre. Le lactose, la caséine, le beurre étaient ainsi étudiés séparément comme des corps simples. Mais la plus grande incertitude régnait sur la cause et la nature des transformations que ces mêmes éléments subissent dans le caillé, au cours de la maturation. La pratique fromagère, conforme à la tradition, savait, en partant du simple lait caillé, préparer une foule de produits dont la pâte se transforme peu à peu dans son aspect, sa texture et sa consistance ; en fin de fabrication elle acquiert une sapidité spécifique qui achève de la caractériser.

Ces modifications plastiques, massives et apparentes qui concernent à la fois les propriétés physiques et chi-

miques des caillés sont communément désignées du terme générique de maturation. L'agent de ces transformations en était inconnu lorsque Pasteur [112], découvrit dans le lait les bactéries qui déterminent la fermentation lactique. Mais, ce fut seulement vers 1880 que Duclaux [34] put établir, après de longs travaux, le rôle primordial des ferments dans le processus de la maturation. A la suite de ses découvertes les recherches fromagères entrèrent dans le domaine du laboratoire ; ses études basées sur de nouvelles conceptions scientifiques furent le point de départ d'innombrables travaux sur les produits les plus divers. Tandis que Duclaux en France étudiait surtout le Cantal et le Brie, Mazé [100] ensuite le Gruyère, le Port-Salut, le Camembert, en Suisse, Freudenreich et Orla-Jensen analysaient l'Emmenthal ; la Hollande, le Danemark, l'Angleterre s'intéressaient à leur fabrication nationale ; l'école américaine travaillait surtout le Cheddar ; en Italie, Gorini [50] dirigeait ses recherches vers le Parmesan, dont il cherchait à fixer la fabrication suivant des données scientifiques. Il n'est fabrication aussi limitée et régionale soit-elle, qui n'ait pu fournir matière à d'intéressantes recherches. L'étonnante richesse de cette documentation, où se heurtent les conceptions les plus opposées, exige, en ce qui nous concerne, un travail de classification et de synthèse, plutôt qu'une analyse critique détaillée. Aussi, en nous bornant à rappeler les grandes idées directrices de la maturation serons-nous volontairement concise.

Les conclusions relatives aux facteurs déterminant

la maturation retiennent trois ordres de faits, selon qu'elles l'attribuent :

- 1° A la seule action des microbes (*Tyrothrix*, ferments lactiques, ferments acidoprotéolytiques, anaérobies) ;
- 2° Au rôle prépondérant des diastases non microbiennes (présure, galactase) ;
- 3° A l'activité microbienne et diastasique combinées ;

1° Théories exclusivement microbiennes de la maturation

a) Rôle des *Tyrothrix*.

De multiples analyses de caillé d'âge différent, Duclaux déduit que la maturation affecte surtout la caséine. D'abord solubilisée, elle se dégrade ensuite en corps de poids moléculaire plus petit tels la leucine, la tyrosine et finalement l'ammoniac ; des acides gras volatiles prennent naissance : les acides acétique, valérianique, butyrique. Duclaux recherche les agents de cette solubilisation ; il isole des ferments, les *Tyrothrix*, bactéries généralement alcalinisantes, aérobies ou anaérobies, qui, grâce à une diastase qu'elles sécrètent, la caséase, dégradent la caséine. La maturation paraît donc l'œuvre des *Tyrothrix* dont l'étude est poursuivie par Roger, Gorini, Adametz.

b) Rôle des ferments lactiques.

L'hypothèse de Duclaux parut trouver une application pratique en fromagerie. Adametz isole un *Tyrothrix*,

le *Bacillus nobilis*, qui, ensemencé artificiellement dans l'Emmenthal, détermine une maturation parfaite. Freudenreich [45] renouvelle en Suisse les essais d'Adametz. Il fabrique de l'Emmenthal avec du lait pasteurisé qu'il ensemence de *Bac. nobilis*. Il suit le développement quotidien de ces *Tyrothrix*. Au début, leur nombre augmente légèrement ; puis, ils cessent de proliférer et disparaissent ; une flore nouvelle formée presque exclusivement de ferments lactiques envahit le caillé. De nouvelles recherches confirment le rôle primordial des ferments lactiques ; l'usage de cultures pures sélectionnées tend à se généraliser dans l'industrie des pâtes cuites. Successivement Orla Jensen, Bøekhout et de Vries, Vinkler et Troili Petersen, Barthel, Rosengreen, Hagglund et Sandberg [64] apportèrent de nouvelles confirmations à la thèse de Freudenreich ; mais Chodat et Hofmann Bang [21] contestent ses conclusions ; par la suite Mazé [100] et Guiltonneau [63] mettent en lumière le rôle des ferments lactiques dans le Gruyère, le Port-Salut, le Cantal.

c) Rôle des ferments acidoprotéolytiques.

La coagulation du lait paraissait déterminée par deux groupes de ferments : les uns donnant de l'acide, les autres de la présure. Dès 1892 Gorini [49] découvre un groupe de bactéries sécrétant simultanément de l'acide et de la présure. Il attribue à ces ferments acidoprotéolytiques la propriété de déterminer la maturation. Ils sont susceptibles d'attaquer la caséine en milieu

acide « qui domine et qui doit dominer dans la pâte du fromage de manière à donner des produits de digestion (non de putréfaction) qui caractérisent la maturation normale ». La température et l'aérobiose modifient leurs fonctions saccharolytique et caséolytique. Des représentants de cocci et de bacilles acidoprotéolytiques ont été trouvés par Burri, Boekhout et De Vries, Russel et Hastings, Harding et Prucha, Alice Evans, Hart et Flint, Hucker, Marcas et Huyge, Barthel et Gerda Troili-Peterson, Grimmer, Kantardjeff, Sadler et Kelly, Gutschy, Mazé, Guittonneau, Virtanen, Laxa, Dalla Torre, dont Gorini [48] cite les travaux.

d) Rôle des anaérobies.

Duclaux avait signalé que certains *Tyrothrix* tels les ferments butyriques vivent en anaérobiose ; par la suite Lindet et Amman [88] les ont trouvés nombreux dans le Camembert. Rodella [115] considère que la maturation est le fait des bactéries anaérobies. Cette question a été des plus controversées.

2° Théories de la maturation mettant en jeu les diastases d'origine non microbienne

a) Action de la présure.

De longue date les praticiens avaient remarqué que la vitesse variable de la maturation dépend en partie de la quantité de présure ajoutée au lait.

En 1893 van Slyke recherche expérimentalement le

rôle de la présure dans la maturation ; ses analyses confirment la haute teneur en azote soluble des fromages préparés avec une forte concentration de présure. Cette solubilisation de la caséine est attribuée à la présence dans le lab d'une diastase protéolytique, la pepsine. Marcas et Huyge [97] indiquent son rôle dans le fromage de Hervé.

Orla Jensen en 1907 signale également les propriétés solubilisantes de la présure ; mais, il considère que la pepsine est à peu près inactive au degré d'acidité correspondant à celui de la pâte. Van Dam [138] met ensuite en évidence que la dissolution du paracaséinate de chaux par le lab est fonction de la concentration en ions H^+ . Il conclut que les microorganismes ne peuvent peptoniser la caséine aussi profondément que le fait la présure ; l'action solubilisante du lab qui revient à la chymosine, est étroitement liée à l'acidité actuelle du milieu.

b) Action de la galactase.

Babcok et Russel [2] pensent au contraire que la maturation doit être attribuée à une diastase unique, préformée dans le lait et qu'ils ont isolée : la galactase. La maturation possible en caves froides leur apparaît comme la preuve évidente de l'activité de la galactase. Gorini s'élève contre cette hypothèse en démontrant que les bactéries peuvent se développer à ces basses températures ; au surplus les micrococcus de la mamelle peuvent sécréter des diastases qui passent dans le lait même trait aseptiquement.

3° Théorie de la maturation basée sur l'action des microbes et des diastases

Elle paraît particulièrement en faveur à l'heure actuelle. Les nouvelles recherches de Van Dam et de Guittonneau [63] apportent de sérieuses précisions en ce qui concerne le rôle de la présure seule ou associée aux ferments lactiques, dans la maturation.

Les contradictions abondent dans la science fromagère ; elles s'expliquent du fait que les connaissances sur les diastases sont incomplètes, le rôle des microbes insuffisamment déterminé, et le caillé un substratum singulièrement complexe. Nombreux sont ceux que l'expérience et la pratique amènent à modifier profondément leurs premières hypothèses. Aussi, faisant abstraction de ces particularités, avons-nous simplement essayé de dégager les grandes idées générales sur la maturation, de façon à placer dans son cadre logique notre étude sur les pâtes molles. Nous nous réservons d'analyser plus particulièrement les travaux qui s'y rapportent.

HISTORIQUE DE LA MATURATION LES FROMAGES A PÂTE MOLLE

La maturation se présente sous deux aspects typiques reliés par une infinité d'intermédiaires :

1° Elle se poursuit à l'intérieur de la pâte sans aucune manifestation organique superficielle (cas des pâtes cuites : Gruyère, Emmenthal) ;

2° Elle est liée à la présence d'organismes sur la croûte ;

a) De bactéries (fromages lavés : Munster, Géromé, Livarot, etc.);

b) De Moisissures et de bactéries (fromages moisis : Camembert, Brie, etc.).

Dans le Camembert deux flores successives et apparentes envahissent la croûte : d'abord des Levures et des Moisissures, puis des bactéries.

La question s'est donc posée de savoir quel est l'agent réel de maturation du Camembert.

1° Les Moisissures déterminent-elles seules, la maturation du Camembert ? S'il en est ainsi cette maturation nettement spécifique n'a aucun rapport avec la maturation du Gruyère ou du Munster. L'apparition de bactéries sur le Camembert ne serait alors qu'un « incident » ou un « accident » suivant l'expression de Thom ;

2° La maturation du Camembert entre-t-elle au contraire dans le cadre général ? Si les diastases naturelles (présure-galactase) ou les microbes (ferments lactiques, acido-protéolytiques, anaérobies) déterminent la maturation, les Moisissures ne sont plus qu'un épiphénomène.

3° Reste enfin une dernière hypothèse accordant uniquement à l'association fongique et bactérienne, la maturation du Camembert.

Les travaux se rapportant uniquement à la maturation du Camembert sont très peu nombreux. Duclaux [34], Epstein [40], Roger [116-117], Mazé [101-102], Lindet, Amman et Houdet [88], Mesnil [104], Arthaud

Berthet [1], Loubière [90], Weidmann [143] ont envisagé plus ou moins directement cette question. L'école américaine a apporté un sérieux tribut avec les travaux de Conn [25], Thom [131, 132, 133, 1355, 136]. Stocking, Isajeff [70], Dox [33], Doane [31], Bosworth [8].

Duclaux [36] met en évidence la production de caséase chez le *Penicillium*. Il n'attribue cependant aux Moisissures qu'un rôle secondaire ; elles se bornent d'après lui à réduire l'acidité du caillé où peuvent se développer les agents de la maturation : les *Tyrothrix*.

Pour Epstein [40], l'affinage du Camembert est uniquement l'œuvre des bactéries ; les Moisissures ne jouent aucun rôle ; elles paraissent même inutiles. Il mentionne cependant que dans le Brie le *Penicillium album* dégrade la caséine. Roger [117], au contraire, voit dans le *Penicillium* un élément essentiel ; son action doit se combiner à celle de bactéries déterminées qui achèvent la maturation.

Les travaux de l'école américaine attribuent aussi à la Moisissure un rôle primordial. Conn [25] et Thom [131] considèrent que le changement de texture de la pâte est dû au *Penicillium camemberti* ; ses diastases provoquent la solubilisation de la caséine à de fortes distances du mycélicum. L'*Oidium lactis* est une Moisissure constante du Camembert ; sa présence paraît liée à l'arôme. Les recherches pour isoler une bactérie spécifique sont toujours demeurées infructueuses ; de même, lesensemencements sur fromages frais, de bactéries prélevées à l'intérieur, ou sur la croûte de fromages affinés, n'ont donné aucun résultat.

Les conclusions de Mazé [102] sont tout autres : les Moisissures ne doivent attaquer la caséine que pour subvenir à leurs besoins en éléments azotés. Les bactéries du « rouge » arrêtent le développement des Moisissures, et alcalinisent les couches superficielles par la production de NH_3 . La maturation proprement dite est l'œuvre des diastases que les ferments lactiques ont régulièrement déposées dans la totalité de la pâte. Leur activité ne deviendra effective qu'en milieu alcalin. De là le sens centripète de la maturation. L'action solubilisante de NH_3 sur la caséine vient compléter sa digestion diastatique.

Arthaud-Bertet [1] a isolé un *Oïdium*, qu'il considère un élément spécifique du Camembert. Mazé constate d'ailleurs que dans les bonnes fabriques on attribue plus d'importance à l'*Oïdium* qu'à la Moisissure.

Lindet, Amman et Houdet [88] concluent que « les gras du Camembert présentent une odeur franche d'acide butyrique et distillent à la façon de celui-ci ; ils ne fermentent pas d'acide lactique même au début... On ne peut donc admettre, comme on le faisait jusqu'ici que l'acide lactique apparaît au début et se trouve ensuite brûlé par les Moisissures ». Ils ont isolé des ferments butyriques nombreux.

En résumé l'ensemble des travaux sur la maturation du Camembert sont contradictoires : Duclaux soutient sa thèse des *Tyrothrix* ; Mazé se range à la théorie des ferments lactiques de Freudenreich ; Lindet paraît faire grand cas des ferments butyriques anaérobies. Enfin d'autres voient uniquement dans les Moisissures, ou

dans des bactéries insuffisamment déterminées, les agents de la maturation du Camembert.

Nous nous sommes proposée de préciser quels sont les agents réels de la maturation du Camembert, et quel est leur rôle respectif. Nous avons divisé notre travail en 3 parties

La PREMIÈRE PARTIE est réservée surtout aux travaux effectués dans différentes usines de Camembert normandes. Nous avons étudié la composition de la flore des fromages normaux ; puis, nous avons cherché en quoi elle diffère de celle des fromages présentant des défauts.

L'étude du pH des fromages a mis en évidence que ces deux flores de composition différente entraînent sur les fromages des réactions de sens opposé.

Nous nous sommes efforcée d'isoler et d'identifier les organismes prédominants de ces deux flores.

La pratique journalière montre que la fabrication est anormale lorsque le salage est trop faible ou exagéré, que les laits sont trop acides, que l'égouttage est insuffisant et que la température est trop élevée. Nous avons donc cherché dans la 2^e PARTIE, quelle sélection déterminent sur les organismes isolés :

- 1^o Le salage ;
- 2^o L'acidité ;
- 3^o La température ;
- 4^o Les associations symbiotiques.

Après avoir ainsi fixé l'influence du milieu sur les organismes nous cherchons quelles transformations le milieu subit à son tour sous l'influence des Moisissures

et des bactéries. L'action sur la réaction du milieu est nettement définie dans la 3^e PARTIE de notre travail, ainsi que les rapports entre la réaction du milieu et la destruction du lactose. Nous examinons ensuite l'effet des diastases de ces organismes.

En reproduisant sur le caillé stérile les phases successives de la fermentation, nous fixons quels sont les agents de la maturation ; les conditions d'une maturation normale en découlent.

M. le P^r Radais, doyen de la Faculté nous a fait l'honneur de nous agréer dans son laboratoire et d'accepter la présidence de cette thèse ; l'intérêt qu'il a témoigné à notre travail nous a valu de mener à bonne fin les recherches dans les centres de production ; nous le prions de croire à notre respectueuse reconnaissance.

M. le P^r Lutz a été pour nous le maître éclairé qui guide et encourage. Loin d'imposer ses vues que justifiaient une connaissance profonde du Brie, il a tenu à ce qu'une observation méthodique, sans opinion préconçue fut la base de ce travail. Nous l'assurons de notre profonde gratitude.

Que M. le P^r agrégé Bach, qui a bien voulu faire partie du jury veuille agréer nos vifs remerciements.

Depuis notre entrée à la Faculté l'intérêt que nous portèrent M. Houdas, préparateur de Chimie et M. Dursent, secrétaire de la Faculté, ne s'est jamais démenti ; qu'ils soient assurés de notre reconnaissance.

Nous tenons à adresser à M. le P^r Kayser, de l'Institut

Agronomique, nos respectueux hommages pour la bienveillance qu'il nous a toujours témoignée.

Nous sommes également heureuse d'exprimer ici notre gratitude à M. le Dr Rollino, attaché commercial de la République Argentine, et à M. le Dr Moussu, professeur à l'école d'Alfort, qui se sont si particulièrement intéressés à nos études.

En Normandie, M. Alba, directeur de la Société Laitière des Fermiers Normands a bien voulu autoriser nos études dans les différentes usines. Partout où notre travail le réclamait, aux usines d'Aunay, de Coulibœuf, de Bernières, ou même au laboratoire de la Faculté, nous avons toujours eu à notre disposition une ample collection d'échantillons. Nous ne saurions trop remercier MM. Alba, Saffrey, Hébert, du soin qu'ils ont pris de faciliter notre travail.

Nous devons à M. le Pr Porcher, directeur de la revue *Le Lait*, la reproduction photographique de nos cultures ; nous le remercions de la bienveillance dont il nous honore et qui est pour nous un précieux encouragement.

Nous nous sommes parfois permis d'aller demander quelques précisions sur leurs travaux à M. le Pr Mazé, de l'Institut Pasteur, à M. le Pr Guiltonneau, directeur du laboratoire des Fermentations à l'Institut Agronomique, à M. Mesnil, directeur du Laboratoire Roger à Lisieux ; nous les remercions vivement de leurs conseils autorisés.

Maintes fois nous avons fait appel à l'érudition de M. Labayle, bibliothécaire de l'Institut Agronomique ; nous lui adressons tous nos remerciements.

PLAN DU TRAVAIL

PREMIÈRE PARTIE

Généralités	19
CHAPITRE I. — Fabrication du camembert.....	19
— II. — Flore superficielle des camemberts	22
— III. — Méthodes de dosage de l'acide lactique du caillé. pH des fromages.....	26
— IV. — Etude systématique des Moisissures et des bactéries.....	33

DEUXIÈME PARTIE

Influence de quelques facteurs sur le développement des organismes	51
CHAPITRE I. — Rôle du sel	51
— II. — Rôle des symbioses en relation avec le salage	61
— III. — Rôle de la réaction du milieu	66
— IV. — Rôle de la température	70

TROISIÈME PARTIE

Effets de l'activité des organismes sur le milieu	73
CHAPITRE I { 1° Action sur la réaction du milieu (rôle du pH primitif).....	73
1° Rapport entre la consommation du su- cre et la réaction du milieu.....	80
— II. — Des diastases sécrétées par les organismes.	87
— III. — L'attaque de la caséine et la maturation.	96
Conclusions	107
Index bibliographique.....	111

PREMIÈRE PARTIE

GÉNÉRALITÉS

CHAPITRE PREMIER

FABRICATION DU CAMEMBERT

Les laits frais, peu acides, titrant une assez grande quantité de matière grasse, sont les laits de choix pour la fabrication du Camembert qui est très délicate. Les marques réputées n'emploient qu'une infime quantité de lait partiellement écrémé. Le caillé provenant de ce lait moins gras et dont on garnit uniquement le fond des moules, n'adhère pas au store, et facilite le retournage.

Le lait chauffé aux environs de 28° est additionné d'une quantité de présure variable avec l'acidité du lait ; elle est calculée en sorte que la coagulation s'achève en 3/4 d'heure. On procède alors au remplissage de moules

cylindriques, percés de trous, et rangés sur de longues tables en bois recouvertes d'un store. Le caillé qu'on prélève avec des cuillers de même diamètre que le moule, est versé avec précautions de façon à le briser le moins possible. Le remplissage doit être achevé en 4 heures. Pour que l'élimination du sérum se poursuive d'une façon régulière, la température des salles de fabrication doit être maintenue à 22° environ. La durée de l'égouttage est variable et dépend de l'acidité des laits, de la dose de présure et de la température ambiante.

Lorsque le caillé est suffisamment égoutté et que la face appliquée contre le store est assez résistante, on retourne le moule et son contenu sens dessus dessous ; l'égouttage se poursuit ; on retire les moules lorsque le bloc de caséine a atteint une certaine consistance déterminée empiriquement. Le salage s'effectue à la main avec du sel fin et sec. On sale d'abord le pourtour et l'une des faces, puis les fromages sont placés sur des plateaux secs en bois recouverts ou non d'un store sec. On les transporte au saloir où l'on sale l'autre face.

Il est d'usage courant dans l'industrie d'ensemencer soit le lait ou le caillé, avec des Moisissures et des bactéries sélectionnées, de façon à obtenir une fermentation aussi régulière que possible. Cependant la présence de ces ferments ne saurait à elle seule assurer une maturation normale. Le lait se trouve contaminé par une foule de germes ; la moindre erreur dans l'appréciation de l'égouttage, dans le salage, ou dans la température du milieu, suffit à faire prédominer certaines espèces saprophytes au détriment des qualités du produit. Aussi cette

fabrication est-elle des plus difficiles à diriger ; la technique est des plus variables ; elle a à tenir compte non seulement d'une matière première des plus changeantes dont elle voudrait pourtant tirer un produit toujours identique à lui-même, mais encore de l'état hygrométrique et de la température qui jouent ici un rôle de premier plan.

Lorsqu'au sortir du saloir les fromages présentent quelques défauts, il est ensuite bien difficile d'y remédier dans les haloirs. Les premiers jours la surface des fromages devient grasse au toucher ; elle prend une teinte légèrement crémée ; puis la Moisissure apparaît et forme un feutrage blanc. Quand la couche mycélienne est jugée assez épaisse on retourne les fromages sur les clayons de façon que les deux faces soient également couvertes de *Penicillium*. On arrête la croissance de la Moisissure en posant les fromages sur une planche pleine en bois qu'on transporte au séchoir. Tous les deux jours on retourne les fromages sur des planches propres ; sur certains points de la croûte apparaissent des zones rouges ; les bactéries envahissent la surface ; l'odeur devient légèrement ammoniacale. L'affinage proprement dit commence ; il s'achèvera dans des caves spéciales.

CHAPITRE II

FLORE SUPERFICIELLE DES CAMEMBERTS

De nos séjours aux usines d'Aunay et de Coulibœuf, et de nos visites à Bernières et à l'usine de St-Loup, nous avons rapporté près de 500 coupes de caillé. C'est dire que l'étude de la flore des fromages des différentes usines a fait l'objet de toute notre attention.

Prélèvement, coloration et montage des coupes. — A l'aide d'une aiguille flambée on prélève une parcelle de fromage soit en surface, sous la croûte, ou en profondeur. On l'étale sur une lame flambée. Après fixation à l'alcool-éther on colore au bleu de méthylène. Ces coupes se conservent montées sur gélatine phéniquée (gélatine 7 gr., eau 42 gr., glycérine 50 gr., acide phénique 1 gr. ; fondre au bain-marie). On recouvre la préparation d'une lamelle dont on lute les bords au ripolin,

Flore des fromages.

Les premiers éléments qui envahissent le caillé sont des Levures ; les éléments sont ronds ou légèrement ovoïdes ; ces Levures appartiendraient au genre *Torula* ; elles seraient accompagnées de Mycodermes et d'autres Levures qu'on ne peut identifier au microscope ; ces Levures recouvrent aussi bien les fromages salés que non salés.

a) FLORE DES FROMAGES BIEN SALÉS. — Après les Levures apparaissent les Moisissures : un *Oïdium* et un *Penicillium*. Dans sa forme caractéristique l'*Oïdium* se présente sous l'aspect d'éléments rectangulaires : les oïdes ; il prend également la forme filamenteuse ; ses filaments sont beaucoup plus larges que ceux du *Penicillium* ; ils se terminent en forme de fourche. On considère généralement qu'après les Levures l'*Oïdium* se développe ; seulement plus tard il laisserait pointer les filaments du *Penicillium*. D'une façon constante nous avons observé que lorsque les premières oïdies apparaissent le caillé porte aussi des filaments mycéliens. Ceux-ci n'ont pas l'épaisseur de ceux de l'*Oïdium* ; ils ne sont pas hyalins comme ces derniers ; ils présentent les caractères de filaments de *Penicillium*. On ne peut différencier les filaments des Moisissures d'après la fructification, car il est de règle dans l'industrie d'écraser la Moisissure avant son complet développement.

Au moment de l'affinage les bactéries du rouge succèdent par place aux Moisissures ; ces bactéries aux

formes variées ne se colorent pas toutes par la méthode de Gram.

C'est surtout par leur teneur en *Oïdium* que se distinguent les flores des fromages des différentes usines. Très probablement la disposition, l'orientation et l'aération des locaux doivent favoriser dans certaines usines le développement du *Penicillium*. Cependant dans la plupart des cas, c'est contre l'*Oïdium* que le praticien doit lutter. A l'usine de Bernières où le salage est pourtant très léger, nous avons trouvé relativement peu d'*Oïdium* ; dans d'autres usines avec un égouttage aussi poussé, et un salage beaucoup plus fort, l'*Oïdium* est cependant plus largement représenté.

A l'entrée de l'hiver on retarde le salage ; à ces époques de transition la fabrication n'est pas toujours normale ; les examens microscopiques à l'usine de St-Loup n'ont pas cependant montré un développement exagéré de l'*Oïdium*. Nous avons été frappée dans cette usine de M. Saffrey de la très large aération des haloirs ; il est permis de se demander si cette aération n'influe pas à certains moments d'une façon très heureuse sur la composition de la flore des fromages.

b) FLORE DES FROMAGES INSUFFISAMMENT SALÉS. — Un fait attire l'attention au premier abord : ces fromages sont très peu couverts de *Penicillium* ; parfois même ils ne portent la moindre trace de Moisissure. Au début du halage l'*Oïdium* est largement représenté sous la forme d'oïdies ; mais si l'on fait des prélèvements dans la gangue rougeâtre qui recouvre ensuite ces fromages, on trouve de très nombreuses bactéries. Parmi celles-ci

apparaissent des bâtonnets longs et grêles ; nous avons là une forme de souffrance de l'*Oïdium* ne présentant plus aucun des caractères morphologiques de l'espèce.

D'une façon constante le *Penicillium* ne se développe pas en absence de sel ; l'*Oïdium* et des bactéries recouvrent la croûte ; le fromage coule. Sur les fromages bien salés couverts d'*Oïdium* et de *Penicillium*, le rouge apparaît en temps opportun et la maturation est normale.

CHAPITRE III

MÉTHODES DE DOSAGE DE L'ACIDITÉ DU CAILLÉ pH DES FROMAGES

Depuis les travaux de Duclaux il est établi que l'acidité du Camembert diminue en cours de fabrication ; la réaction devient même alcaline pendant l'affinage. Parallèlement à l'étude de la flore des fromages nous tenions à suivre les variations de leur réaction. Pour mener à bien ce travail dans les centres de production il nous fallait une méthode de dosage rapide, précise, n'exigeant qu'un matériel limité. Dans ce but nous avons comparé la valeur des différentes méthodes susceptibles de doser l'acidité des caillés.

A. — Déterminations titrimétriques de l'acidité lactique

I. — Méthode alcalinimétrique.

C'est la méthode la plus courante ; on triture un poids connu de caillé avec de l'eau ; on dose l'acidité du mé-

lange à l'aide d'une solution titrée de soude ; on prend comme indicateur la phtaléine.

Cette méthode est peu précise :

1° Le virage de la phtaléine étant lent et progressif, on ignore le moment exact où l'on doit arrêter l'addition de soude ;

2° La phtaléine vire en milieu alcalin ($\text{pH} = 8,4$ environ) et non à la neutralité absolue ($\text{pH} = 7$) ; un milieu légèrement alcalin apparaîtra acide vis-à-vis de la phtaléine ;

3° En ajoutant 5 cm^3 de NaOH N/10 à une émulsion de caillé neutre nous n'en avons retrouvé que 3 cm^3 2 (dosage par $\text{SO}_4\text{H}^2 \text{ N/10}$ en présence de phtaléine).

Il s'ensuit donc que dans une émulsion de caillé une partie de la soude versée se combine à un élément autre que l'acide lactique.

II. — Dosage de l'acide lactique à l'état d'aldéhyde.

Une solution sulfurique d'acide lactique oxydée par MnO_4K se transforme en aldéhyde éthylique qu'on dose par différentes méthodes.

a) MÉTHODE DE JÉRUSALEM [76]. L'aldéhyde se transforme en iodoforme en présence d'une quantité d'iode connue et en excès. On dose cet excès par l'hyposulfite de soude ; on en déduit l' I^2 passé en combinaison avec l'aldéhyde formée, dont on connaît ainsi la quantité.

b) MÉTHODE de SOBOLEWA et ZALESKI : [128] L'aldéhyde est dosée au moyen de pyrrol.

c) MÉTHODE de BELLET : [11] On utilise les propriétés

réductrices de l'aldéhyde sur une solution argentique-ammoniac-magnésienne,

Ces différentes méthodes ne sont pas d'une application pratique dans les centres de production,

III. — Dosage de l'acide lactique après salification.

a) MÉTHODE de MAHEU : [94]. En présence de $\text{Co} \cdot \text{Ca}$ l'acide lactique donne du lactate de chaux ; on titre la chaux ainsi dissoute. On la précipite à l'état d'oxalate de chaux ; on décompose ce sel ; on titre l'acide oxalique par $\text{MnO} \cdot \text{K}$. De cette valeur on déduit le poids de Ca primitivement combiné à l'acide lactique.

b) MÉTHODE de SUZUKI et HART [130]. Cette méthode a été appliquée à un dosage d'acide lactique résultant de la décomposition d'un poids connu de lactate de chaux ajouté au fromage. On épuise l'acide lactique par l'éther ; après maintes manipulations on forme du lactate de zinc qu'on pèse.

Cette méthode est réservée au laboratoire.

c) MÉTHODE au ZINC. — Nous avons essayé d'après Denigès [30] de titrer volumétriquement le zinc pouvant se combiner à de l'acide lactique titré, au lait, et au petit lait. On additionne les liquides de ZnO fraîchement précipité ; on porte à l'ébullition qu'on prolonge $1/2$ heure. On dose le zinc dissout par le ferrocyanure de potassium titré ; comme indicateur on prend l'azotate d'urane. ZnO étant insoluble, la quantité mise en excès est éliminée par filtration.

Nous n'indiquerons pas les détails de la technique

(voir Denigès) car avec des solutions titrées acides les erreurs par défaut atteignent 15 %. A titre d'indication nous mentionnerons que la caséine du lait précipite; l'erreur possible due à l'absorption de Zn par cette dernière est éliminée du fait de la filtration. D'après cette méthode un lait dont 10 cm³ sont neutralisés par 1 cm³ 8 de NaOH N/10 (acidité 1 gr. 62 d'acide par litre) aurait en réalité une acidité de 0 gr. 72 calculée en acide lactique, par litre. L'acidité du lait titrée par la soude serait en moyenne 2,2 fois trop forte; ces chiffres doivent nécessairement comporter une erreur de 15 % qui rend moins accusée la différence entre la méthode alcalinimétrique et la méthode au zinc.

B. — Détermination de l'acidité ionique

Les titrages de l'acidité par voie chimique étant imprécis, nous n'avons eu d'autre ressource que déterminer le pH des fromages. Nous ne disposions à cet effet que de la méthode colorimétrique de Clark et Lubs [22]. Sans doute elle n'est pas au-dessus de toute critique; la nécessité d'émulsionner le fromage dans l'eau, la présence des protéines et de NaCl peuvent modifier l'équilibre des ions.

Nous n'attribuerons donc pas une valeur intrinsèque absolue aux pH que nous avons déterminés sur les fromages. Ils semblent néanmoins, dans la valeur relative des uns par rapport aux autres, donner une image exacte de la marche des phénomènes.

pH des Fromages
Rapports avec la flore superficielle

Ces déterminations de pH se rapportent à la fabrication d'été de l'usine de Coulibœuf.

Technique. — On pèse 1 gr. de caillé prélevé en surface en couche mince ; on le délaye dans 10 cm³ d'eau bouillie ramenée à pH = 7 à défaut d'eau distillée ; par trituration on obtient une émulsion homogène. Dans un tube en pyrex de même diamètre que ceux de l'échelle de Clark et Lubs, on verse avec des pipettes bien sèches :

- a) 1 cm³ d'émulsion de caillé ou de fromage ;
- b) 3 cm³ d'eau neutre pour éclaircir la masse ;
- c) des colorants du pH en quantité correspondant à 1 cm³ d'émulsion primitive. On prépare un tube compensateur avec 1 cm³ d'émulsion de caillé et 3 cm³ d'eau neutre. On recherche dans l'échelle étalonnée de Clark et Lubs, le tube qui, superposé au tube compensateur, reproduit la même teinte que l'émulsion de fromage.

De l'identité des teintes, avec un même colorant, on déduit l'identité des pH.

Résultats. — Nous avons trouvé les pH suivants :

Caillé en moule.	pH =	4,2 à 4,4
Fromages bien salés : 5 ^e jour	=	5,8 à 6,4
12 ^e —	=	6,4 à 6,6
Fromages trop peu salés : 5 ^e jour	=	6,4 à 7,2
12 ^e —	=	8,4 à 8,6

pH DES FROMAGES BIEN SALÉS. — Pour suivre plus aisément les variations de pH des fromages nous traçons

ci-dessous la courbe des pH en fonction du temps.

La courbe des fromages bien salés montre que :

1° l'acidité diminue depuis la mise en moule jusqu'au moment de l'affinage ; le pH passe de 4,3 en moyenne à 6,5 ;

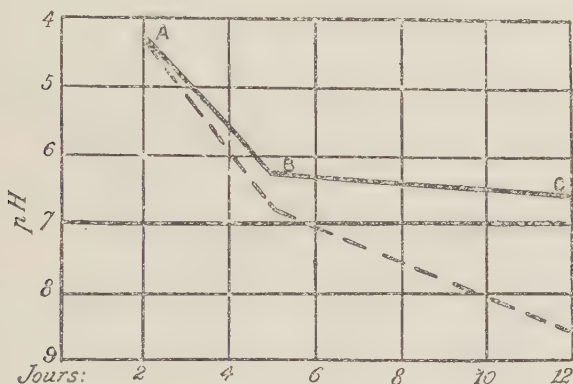


FIG. 1 — Variation de pH des fromages
bien salés (— — —), trop peu salés (— —)

2° la neutralisation de la pâte est irrégulière. On distingue :

a) une brusque neutralisation partielle (portion A-B de la courbe) ; on passe de $\text{pH} = 4,3$ à $\text{pH} = 6,2$. Quand $\text{pH} = 6,2$ les Moisissures (*Penicillium*, *Oïdium*) forment un léger duvet ;

b) une variation très faible du pH pendant le développement du *Penicillium* (portion B. C. de la courbe) ; parfois même le pH semble demeurer constant du 5^e au 12^e jour de fabrication ; il passe à peine ici de $\text{pH} = 6,2$ à $\text{pH} = 6,5$;

3° La réaction est encore acide $\text{pH} = 6,5$ quand les fromages sont portés au séchoir (12° jour de fabrication en été).

pH DES FROMAGES INSUFFISAMMENT SALÉS. — Les cinq premiers jours la réaction est légèrement moins acide qu'avec les fromages bien salés ; elle varie entre $\text{pH} = 6,4$ et $7,2$ au lieu de $\text{pH} = 6,2$ pour les fromages normaux.

Du 5° au 12° jours le pH augmente ; le milieu devient alcalin et atteint $\text{pH} = 8,5$ en moyenne.

D'après cette étude il résulte que les fromages bien salés et insuffisamment salés se distinguent :

1° par leur réaction à la fin du halage : réaction acide $\text{pH} = 6,4$ pour les fromages bien salés ; réaction alcaline $\text{pH} = 8,5$ avec une dose insuffisante de sel ;

2° par le mouvement, que suit la neutralisation de la pâte ; les fromages trop peu salés se neutralisent et s'alcalinisent en suivant un mouvement uniforme et régulier ; avec les fromages bien salés la neutralisation n'est pas progressive ; elle procède par saccades ; au moment où le *Penicillium* se développe elle subit presque un temps d'arrêt ;

3° par la flore superficielle ; nous avons précédemment montré que les fromages bien salés sont couverts d'*Oïdium* et de *Penicillium* ; le « rouge » leur succède. Le *Penicillium* ne se développe pas avec un salage insuffisant ; l'*Oïdium* et des bactéries envahissent la croûte des fromages ; cette flore est alcalinisante.

Ces deux flores de composition différente déterminent donc sur le caillé deux réactions de signe contraire.

CHAPITRE IV

ÉTUDE SYSTÉMATIQUE DES MOISSURES ET DES BACTÉRIES

A la Société de l'Abbaye de St-Georges d'Aunay (Calvados), nous avons fait choix en hiver de nombreux échantillons de caillé et de fromage. A l'aide d'une spatule en platine flambée, nous avons prélevé sous la croûte, de petits fragments de caillé qui ont été déposés dans des tubes contenant du caillé stérile.

Deux Moisissures ont été isolées et étudiées : un *Oïdium* et un *Penicillium*. Nous avons obtenu en culture pure différentes espèces bactériennes : des cocci de $2,8\ \mu$, prenant le Gram et liquéfiant très rapidement la gélatine ; des bacilles dont une espèce formée de bâtonnets de $5\ \mu$ de long, aux extrémités effilées, ne prend pas le Gram. Les éléments d'une autre souche sont extrêmement courts ($0,8\ \mu$) et prennent le Gram. Nous avons étudié seulement une bactérie dont les formes d'involution sont nombreuses et qui présente un bouquet spécifique de Camembert.

Sur les fromages insuffisamment salés nous avons prélevé le mélange des bactéries ; l'isolement en culture pure eût été fort long et de moyen intérêt ; nous avons préféré étudier l'action globale de ces bactéries qui seule nous intéressait.

A. — Etude du *Penicillium*

a) *Méthode d'isolement.* — Nous avons procédé à des cultures monospores suivant la technique de Bainier ; en cellule de Van Thieghem le petit lait forme des dépôts cristallins qui rendent malaisée la numération des spores ; le milieu de Sabouraud remplace avantageusement le petit lait ; il est préparé avec :

Glucose	20 gr.
Peptone	10 gr.
Eau.	1000 gr.

On porte le mélange à l'ébullition ; on filtre, répartit en tubes et stérilise à 120° pendant 1/4 d'heure.

La spore germée en goutte pendante est portée sur le milieu de Sabouraud solidifié (gélrose et gélatine à 20 gr. ‰).

b) *Identification.* — La détermination de l'espèce a été poursuivie en tenant compte :

1° Des caractères cultureux suivant la méthode de Biourge [16] ;

2° Des caractères morphologiques ;

3° En contrôlant ces caractères sur une souche type de l'Institut Pasteur, due à l'obligeance de M. Mazé.

Préparation des milieux de culture

Pour nous conformer aux travaux de Biourge, les milieux ont été préparés selon sa technique [16].

a) MILIEU DE RAULIN

Il se compose de :

Sucre candi	70 gr.
Acide tartrique	4 »
Azotate d'ammoniaque	4 »
Phosphate d'ammoniaque	0 6 »
Carbonate de potasse	0.6 »
Sulfate d'ammoniaque	0,25 »
Sulfate de zinc	0,07 »
Sulfate de fer.	0,07 »
Silicate de potasse	0,07 »
Eau	1500 »

A ces éléments dissous à chaud, on ajoute 15 % de gélatine ; après filtration au coton on répartit en tubes, et on stérilise pendant 1/4 d'heure à 115°. Tous les milieux gélatinés ont reçu la même quantité de gélatine (15 %) et ont été stérilisés à la même température que le Raulin ; nous n'indiquerons donc pour les milieux que les particularités.

b) MILIEU DE RAULIN-LUTZ. — Il diffère du Raulin par les modifications suivantes.

Carbonate de magnésie	0,13 gr.
Tartrate de potassium	4,36 »
Phosphate neutre de potassium.	0,40 »
Sulfate de potassium	0,16 »
Azotate d'ammoniaque	3,65 »

Milieu gélatiné et stérilisé comme le Raulin.

c) MILIEU DE HAYDUCK.

Phosphate bipotassique	1 gr.
Sulfate de magnésium	0,32 »
Asparagine	0,8 »
Saccharose	80 »
Eau	1000 »

Milieu gélatiné à 10 % seulement.

d) MOÛT DE BIÈRE. — A 300 gr. de malt dépourvu de radiceles et concassé, on ajoute 500 cm³ d'eau à 50°.

On verse ensuite de l'eau bouillante jusqu'à ce que la température du mélange ait atteint 70° ; après filtration sur toile on fait subir au milieu une cuisson de 3 heures à feu nu ; on doit éviter l'ébullition. Après une dernière filtration au papier on gélatine le milieu à 10 %.

e) LAIT. — Réparti en tubes sans écrémage préalable. Stérilisation : 1/4 d'heure à 115° ; occasionnellement, on a ajouté du tournesol ou de la phtaléine (quelques gouttes).

f) CAILLÉ. — On coagule le lait à la présure Hansen ; le caillé égoutté est stérilisé à 115° pendant 1/4 d'heure.

g) PAIN. — Cubes de mie de pain rassis de 1 cm³ de côté ; on les imbibe de quelques gouttes d'eau. Stérilisation à 120° pendant 1/4 d'heure.

h) BIÈRE. — Tyndallisée à 60° pendant 1 h. 1/2 ; on répète l'opération 4 jours de suite.

i) BOUILLON. — Dissolution à feu nu de :

Peptone	20 gr.
Saccharose	50 »
Glycérine	30 »
Eau	1000 »

On gélatine à raison de 10 % ; une partie du bouillon est alcalinisée.

j) Riz. — Cuit à l'eau et stérilisé à 120° pendant 1/4 d'heure.

k) CAROTTES. — POMME DE TERRE. Stérilisation à 120° pendant 1/4 d'heure.

l) EAU DE PRUNEAUX. — L'eau de macération des pruneaux est filtré au papier et gélatinée à 15 %. Stérilisation comme à l'ordinaire. La macération de haricots est gélosée à 3 %.

MÉTHODES D'ENSEMENCEMENT ET DE CULTURE. — Les milieuxensemencés avec du mycélium sporulé sont placés à l'étuve à 24°.

Nous donnerons un résumé extrêmement succinct des cultures dont les teintes ont été notées d'après le code des couleurs de Klincksieck et Valette [82].

Caractères culturaux

Les cultures débutent par des points opalins (Raulin neutre), blanc grisâtres (Hayduck) ou d'aspect gélatineux (bouillon alcalin). Le mycélium est généralement blanc ; on note une légère pigmentation lilas (578A, 78A, 3A) avec le riz, haricot agar, Sabouraud.

La pigmentation est d'un jaune fugace (221-271) sur le moût de bière, bouillon acide et alcalin. En vieillissant les mycélium prennent une teinte légèrement crémée. Des gouttelettes incolores ou dorées, plus ou moins fugaces, parsèment le mycélium. Les milieux subissent de profondes modifications ; ils se liquéfient et se colorent souvent de façon très marquée (teinte groseille 81-82 avec bouillon acide ; brunissement du

Raulin neutre et du pain). La bière présente une limpidité parfaite ; le lait jaunit ; il est le siège d'une profonde peptonisation (même fait constaté par Sartory [125]). Après quelques semaines le caillé tournesolé s'alcalinise et dégage une forte odeur ammoniacale.

Caractères morphologiques.

Les spores, rondes ou légèrement ovoïdes, ne portent aucune ornementation ; leurs dimensions varient entre $2,4 \mu = 3,3 \mu$ et $3,2 \mu = 4,8 \mu$. Les phialides présentent $3,2 \mu$ sur $9,6 - 12,8 \mu$ de long ; elles sont associées par groupe de deux ou trois ; sur chaque phialide peuvent s'insérer à leur tour 2,3 ou 4 chapelets de spores.

Les caractères cultureux et morphologiques correspondent à ceux du *Penicillium candidum* Roger décrits par Biourge [16].

Les minimales différences que nous avons pu noter (Bouillon 81-82 au lieu de 146 avec la souche de Biourge ; brunissement du Raulin neutre ou acide, pigmentation lilas parfois très accusée de mycélium) se sont montrées plus ou moins inconstantes avec une souche type de *Penicillium candidum* de l'Institut Pasteur ; aussi n'y a-t-il pas lieu d'en tenir compte. Notre souche présente donc les caractères spécifiques du *Penicillium candidum* Rog.

Réaction du milieu et pigmentation du mycélium. — Sur les fromages au moment où les ferments du rouge sont sur le point de percer, la Moississure présente par-

fois une légère coloration rosée. L'acidité des fromages étant alors très réduite il paraissait opportun d'examiner si une réaction particulière déterminait cette pigmentation. A du Sabouraud neutre, nous avons ajouté des quantités croissantes de soude ou d'acide lactique (technique p. 66). La pigmentation lilas est apparue aussi bien en milieu alcalin qu'en milieu acide ; son intensité n'était d'ailleurs pas constante. La réaction du milieu ne joue donc aucun rôle dans l'apparition des pigments du *Penicillium candidum*.

B. — Etude de l'Oïdium

Duclaux [34], Lang et Freudenreich [85], Marchal [98], Eckles [37] ont fixé les caractères de différentes espèces d'*Oïdium*.

Après maints passages sur des géloses de Sabouraud acides, nous avons isolé en culture pure une souche d'*Oïdium* présentant les caractères suivants :

1^o Caractères cultureux (cultures maintenues à 24°).

a) *Carotte*. — L'*Oïdium* forme une épaisse couche irrégulière de couleur terne ; aspect mouillé ; toute la surface est hérissée de poils dont l'extrémité libre est amincie.

b) *Pomme de terre*. — Aspect caractéristique ; colonies blanches sans filaments apparents et d'aspect farineux.

c) *Réglisse*. — Culture misérable, traînées blanchâtres.

d) *Raulin acide*. — Aspect spongieux du mycélium ; la liquéfaction ne commence qu'après un mois de culture, à la température ambiante.

e) *Haricot-agar*. — Pousse difficilement.

f) *Lait et petit-lait*. — Epaisse couche gluante, aspect brillant qui envahit rapidement la totalité du liquide.

g) *Caillé*. — Couche gluante, brillante.

h) *Gélose* de Sabouraud. — Le plus souvent les colonies muriformes sont hérissées en forme d'oursin ; parfois le mycélium jaune terne est sec, peu compact, d'aspect spongieux.

i) *Liquide* de Sabouraud. — Développement limité ; traînées glaireuses dans la totalité du liquide.

2° Caractères morphologiques.

L'*Oïdium* peut se présenter sous différentes formes : le plus souvent ses articles sont rectangulaires, mais il peut également prendre la forme filamenteuse.

Certaines oïdies mesurent $8\ \mu$ de long sur $2\ \mu$ de large : ce sont les plus petites ; on trouve encore des éléments en forme de tonnelet de $9,6 - 12,8\ \mu = 6,4 - 8\ \mu$. Certains articles atteignent $17,6\ \mu = 4,8\ \mu$. Les filaments sont souvent très longs : leur largeur varie entre $3,1\ \mu$ et $6,4\ \mu$.

Ces caractères sont spécifiques à l'*Oïdium lactis* Fres (Saccardo [122]).

C. — Etude de la Bactérie

Cette bactérie provient d'une souche de ferments du rouge prélevée au séchoir de l'usine d'Aunay-sur-Odon (Calvados).

Son isolement en culture pure a été long et malaisé du fait de son extrême polymorphisme. Elle présente quelques analogies avec le *Coli* dont Bezançon [15] donne la description suivante : « Le *Coli* est un microbe très polymorphe. Il se présente le plus souvent sous l'aspect de bâtonnets de 2 à 6 μ de long à extrémités arrondies, mais on peut dans la même culture trouver des formes courtes, coccobacillaires, ou de véritables filaments. » Agasse Lafont ajoute que le *Coli* présente parfois l'aspect bipolaire.

Dans nos cultures nous avons en effet trouvé :

1° Des bâtonnets de 3 à 5 μ à bouts arrondis ; ces bacilles sont droits ou légèrement incurvés ;

2° Des formes très courtes présentant des granulations bipolaires ; leur longueur varie entre 0,5 et 1 μ ;

3° Parfois nous avons observé des formes d'involution en navette comme dans le bacille d'Eberth ;

4° Dans les vieilles cultures les bacilles forment des chaînes de 4 à 5 éléments ; la forme filamenteuse est très rare et ne s'observe que dans certaines symbioses.

Cette bactérie ne présente jamais de spores.

Action des colorants. — Elle se comporte comme le *Coli*. Elle ne prend pas le Gram ; elle se colore bien par les colorants d'aniline (bleu de méthylène, fuschine,

thionine) ; ils se fixent souvent avec plus d'intensité en certains points.

Distinction avec le Coli. — Le *Coli* est mobile, tandis que notre bactérie est immobile ; ses caractères cultureux ne correspondent pas à ceux du *Coli*. Notre bactérie en diffère en plus par son arôme : elle communique aux milieux peptonés un bouquet caractéristique de Camembert.

Milieux de culture

a) BOUILLON. — On dissout à feu modéré :

Extrait de viande Liebig	10 gr.
Peptone	20 »
NaCl	5 »
H ² O.	1000 »

On fait digérer à l'autoclave pendant 15 minutes à 120° ; après filtration à chaud sur filtre mouillé, on répartit en tubes et stérilise à 115° pendant 1/4 d'heure.

Dans certains tubes on ajoute 2 cm³ d'huile de lin avant la stérilisation.

b) BOUILLON MALTÉ. — Il a été préparé avec du malt à défaut de touraillon.

Malt	300 gr.
Eau	1000 »

On fait bouillir une demi-heure ; on passe avec expression ; on ajoute :

Peptone	10 gr.
Lactose	20 »

Après filtration, on répartit en ballons de 100 cm³ ; on ajoute 3 gr. de CO³ Ca précipité. On stérilise (1/4 d'heure à 120°).

c) Lait : Stérilisation à 115° pendant 1/4 d'heure sans aucun écrémage préalable. La préparation des autres milieux a été précédemment indiquée.

Caractères culturaux

1. *Pomme de terre* : En quelques jours la totalité de la surface se recouvre d'un enduit épais, non visqueux, brillant, couleur crémée.

2. *Gélatine en stries* : Pas de liquéfaction ; enduit blanchâtre ou colonies isolées de la grosseur d'une tête d'épingle.

3. *Gélatine en piqure* : Pas de liquéfaction, petites colonies le long de la piqure.

4. *Bouillon* : Se trouble dès le 2^e jour, voile épais, sec, blanchâtre, strié ; dépôt muqueux jaune.

5. *Bouillon gélosé* (à 2 %) : Colonies porcelanées, bords réguliers ; elles brunissent en vieillissant.

6. *Sérum coagulé* de l'Inst. Pasteur : léger enduit blanchâtre dès le 2^e jour ; pas de liquéfaction.

7. *Lait* : En fioles d'Erlenmeyer il coagule dès le 6^e jour ; en tubes la coagulation est extrêmement lente et ne commence qu'après plus de deux mois de culture ; le sérum est clair. Richet [114] a montré que la rapidité de la coagulation est liée à la surface libre du lait. Le lait prend une teinte légèrement rosée. En présence de Co³Ca il ne coagule pas.

Gélose au lait : Enduit porcelané peu abondant.

8. *Bouillon malté* : Se trouble. Arôme de fruits.

9. *Bouillon surmonté d'huile de lin* : Se trouble dès le

2^e jour ; cette bactérie peut donc vivre en milieu privé d'air.

10. *Gélose de Veillon* : Se développe surtout en surface ; pas colonies en profondeur.

11. *Gélose de Sabouraud* : Colonies légèrement jaunes, donnant ensuite un enduit épais ; arôme caractéristique de Camembert.

12. *Gélose de Sabouraud* ayant bruni après plusieurs stérilisations. Le développement est aussi abondant que sur la gélose fraîchement préparée ; le bouquet est très nettement exalté.

Cette bactérie est donc surtout aérobie ; anaérobie facultative elle paraît coaguler le lait par acidification.

Recherche de l'acide lactique.

Des fioles d'ERLENMEYER contenant 100 cm³ de bouillon malté + 3 gr. de Co³Ca sont placées, après commencement, à l'étuve à 37°. On agite plusieurs fois les fioles pendant la journée. Après 48 heures on porte la culture à l'ébullition et on filtre. En vue de rechercher l'acide lactique nous avons suivi la technique de MAHEU [94].

a) *Formation d'iodoforme*. — A 1 cm³ de bouillon on ajoute 1 cm³ de solution iodo-iodurée et un peu de soude ; en présence d'acide lactique il se forme de l'iodoforme. Avec notre culture l'odeur d'iodoforme est à peine perceptible ; on peut la rendre plus prononcée en opérant de la façon suivante : le bouillon filtré est additionné de SO³H² ; on filtre ; on agite avec une quantité

à peu près équivalente d'éther (10 cm³ environ) qui entraîne l'acide lactique ; on décante l'éther qu'on laisse évaporer à basse température. Sur le résidu, repris par l'eau, on fait la réaction précédente ; l'odeur d'iodoforme était ainsi très nette avec nos cultures. L'iodoforme présente des cristaux hexagonaux que nous avons trouvés dans le liquide examiné au microscope. Comme l'iodoforme peut se former à partir de l'alcool, nous nous sommes assurée à l'aide d'un cristal de fuschine que l'éther ne contenait pas d'alcool.

b) *Réaction d'UFFELMANN.* — Le réactif d'Uffelmann.

Eau phéniquée à 4/1.000.	20 cm ³
Fe ² Cl ⁶	1 goutte

vire du bleu au jaune en présence d'acide lactique. La quantité d'acide lactique des cultures était trop faible pour donner cette réaction. La réaction de l'iodoforme est beaucoup plus sensible ; nous pouvons conclure que notre bactérie appartient au groupe des *ferments lactiques*.

Acidification du lait.

Des fioles d'Erlenmeyer de 8 cm. de diamètre ont reçu 10 cm³ de lait mesurés à la pipette à 2 traits. Après stérilisation à 115° pendant 1/4 d'heure et ensemencement, les fioles sont placées à l'étuve à 24°.

L'acidité primitive de 10 cm³ de lait, titrée en présence de phtaléine, équivaut à 1 cm³ 90 de soude décinormale ; elle augmente progressivement ; lorsqu'elle est

égale à 5 cm³ 80 de soude N/10 le lait commence à se coaguler, (8^e jour) ; la coagulation est totale le 10^e jour lorsque le lait titre 7 cm³ 25 de NaOH, N/10 ; le 24^e jour l'acidité équivant à 9 cm³ 90 de soude. L'acidification du milieu paraît donc déterminer la coagulation.

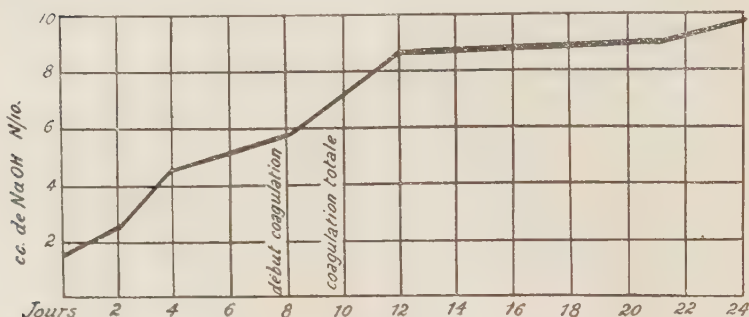


FIG. 2. — Acidification de 10 cm³ de lait placés dans des fioles d'Erlenmeyer

Résistance à l'acidité

Du bouillon de Liebig est ajusté aux différents pH acides. Vers le 3^e jour les ferments lactiques se développent sur tous les milieux compris entre pH = 7 et pH = 4,5. Ces bactéries se caractérisent par leur grande résistance à l'acidité.

Etude de la fermentation des sucres

L'attaque des sucres par les organismes entraîne l'acidification des milieux. Le virage d'indicateurs colorés (teinture de tournesol-bromocrésol pourpre) qu'on

ajoute aux cultures, traduit la moindre acidification des cultures.

Géloses tournesolées. — Dans 20 cm³ de teinture de tournesol on dissout 1 gramme de l'un des sucres suivants : saccharose-glucose-lactose-galactose-maltose. On ajoute 15 cm³ de cette solution à 50 cm³ de bouillon Liebig (formule précédemment). Le milieu est gélosé à 3 %, puis stérilisé pendant 1/4 d'heure à 115°.

Milieux additionnés de bromocrésol pourpre. — Dans 100 cm³ d'eau on dissout 2 gr. de peptone et 3 gr. de l'un des sucres mentionnés. On ajoute 11 gouttes de bromocrésol pourpre par centimètre cube de milieu. On stérilise à 115° pendant 1/4 d'heure. Les cultures sont maintenues à l'étuve réglée à 24°.

Après 48 heures de culture l'acidification de la gélose galactosée est très marquée. L'acidification est plus légère en milieu glucosé. Ce n'est qu'après plus d'un mois de culture que les autres sucres sont attaqués dans l'ordre suivant : lactose-saccharose-maltose.

L'acidification des milieux liquides additionnés de bromocrésol pourpre est souvent plus rapide.

On observe :

Après 24 heures	fermentation	glucose
— 48 heures	»	galactose
— 15 jours	»	lactose
— 3 mois	»	saccharose

Le maltose est à peine attaqué.

Les sucres sont donc attaqués dans l'ordre suivant : glucose-galactose-lactose-saccharose-maltose. La bacté-

rie assimile difficilement les bioses ; l'attaque lente du lactose explique la faible acidification du lait, et sa coagulation tardive.

Etude de la fermentation des substances protéiques

1° *Blanc d'œuf* : Des cubes de blanc d'œuf coagulé placés dans des milieux nutritifs, ne semblaient pas attaqués par les ferments lactiques après plusieurs mois de culture. Pour mettre nettement en évidence une faible attaque de l'albumine nous avons coloré le blanc d'œuf à l'aide de carmin en solution.

On agite dans un tube le mélange blanc d'œuf carmin ; lorsque la masse est uniformément colorée on plonge le tube dans l'eau bouillante. Après coagulation, on laisse refroidir et casse le tube ; on découpe l'albumine en cubes que l'on place dans des tubes à pomme de terre. On ajoute 10 cm³ de milieu d'Utchinsky ainsi préparé :

Glycérine.	40 cc.
Lactate d'ammoniaque.	7 grammes
Asparaginate de sodium	3 —
Chlorure de sodium	5 —
Phosphate bipotassique	2 —
Sulfate de magnésium	0,4 —
Chlorure de calcium	0,1 —
Eau	1000 —

Au fur et à mesure que l'albumine est dissoute le milieu se colore avec plus d'intensité.

Dans la même expérience nous avons remplacé le milieu d'Utchinsky par de l'eau lactosée à 2 %. Tous les milieux

ont été stérilisés à 115° pendant $1/4$ d'heure ; au cours de la stérilisation l'albumine a été entièrement hydrolysée dans l'eau lactosée. Elle est restée intacte dans ce même milieu recouvert d'huile de lin, et dans le milieu d'Utchinsky.

Les cultures sont maintenues à 24° . Après 10 jours le milieu d'Utchinsky se colore en lilas ; la teinte devient ensuite de plus en plus prononcée. Les ferments lactiques sont doués d'un pouvoir peptique. A titre d'indication nous mentionnerons que le blanc d'œuf hydrolysé dans l'eau lactosée a été coagulé par les ferments lactiques.

2° *Fibrine*. — Dans un ballon de 500 cm^3 , on ajoute 250 cm^3 de liquide d'Utchinsky à 30 gr. de fibrine lavée. On stérilise à 115° pendant $1/4$ d'heure. Cultures à 24° pendant 20 jours ; on agite tous les jours. Sur le milieu de culture on identifie les produits de dégradation de la fibrine :

1° A quelques centimètres cubes de milieu on ajoute quelques gouttes d'acide acétique cristallisable, on porte à l'ébullition et on filtre ; on précipite ainsi les albumines non modifiées ;

2° Au filtrat on ajoute du sulfate d'ammoniaque à saturation. Nous avons obtenu un léger précipité d'albumoses ; dans le filtrat nous avons recherché les peptones par la réaction du biuret (filtrat étendu d'eau + 1 cm^3 solution de soude à 10 % + solution de sulfate cuivrique goutte à goutte). Nous n'avons pas obtenu la teinte rose violacé indiquant la présence de peptones.

La fibrine est donc attaquée jusqu'au stade albumose seulement.

3° *Caséine*. — Avant la coagulation, le lait en tube présente une teinte légèrement rosée, c'est à ce moment que nous avons recherché si la caséine était attaquée.

La culture sur lait est bouillie, puis additionnée de sel et d'acide acétique cristallisable, à l'ébullition. On filtre au papier.

Au filtrat on ajoute du réactif de Tanret.

KI.	3.32 gr.
HgI ²	1.35 gr.
CH ³ -COOH crist. . . .	20 cm ³
H ² O qs.	60 cm ³

On obtient un précipité soluble à chaud, mais qui se reforme par refroidissement (albumoses ou peptone); par le sulfate d'ammoniaque à saturation on obtient un précipité qui caractérise les albumoses.

Les ferments lactiques étudiés solubilisent donc le blanc d'œuf, la fibrine, et la caséine ; ils coagulent le lait par acidification. La faculté de solubiliser la caséine en milieu acide semble devoir les rattacher au groupe des *ferments acidoprotéolytiques* de Gorini [47]. Ces ferments lactiques sont de plus anaérobies facultatifs, ils résistent à l'acidité et provoquent l'arôme du Camembert. Leurs propriétés laissent déjà prévoir la part qu'ils prennent dans la maturation du Camembert.

DEUXIÈME PARTIE

INFLUENCE DE QUELQUES FACTEURS SUR LE DÉVELOPPEMENT DES ORGANISMES

Les organismes des Camemberts de choix étant ainsi identifiés, nous examinerons le rôle de différents facteurs sur leur développement. Successivement seront étudiés les rôles : 1° du sel, 2° des symbioses, 3° de la réaction du milieu, 4° de la température sur la croissance du *Penicillium* de l'*Oïdium*, et des ferments lactiques.

CHAPITRE I

RÔLE DU SEL

Le chlorure de sodium est d'un emploi courant en laiterie (beurrerie-fromagerie) ; de là sans doute les travaux très nombreux qui s'y rapportent.

1° En laiterie on envisage surtout l'action antiseptique du sel :

a) Action sur les ferments lactiques : nous citerons entre autres Orla-Jensen, Fettick [42], Thom [136], Conn [25], Lindet [89], Klein et Kirsten ;

b) Action sur les Moisissures : Fettick [42], Golding, Mesnil [104], Langlais [86], Mazé [101], Gutschy, Clayton [23] ;

c) Action sur les Levures : Speakman, Gee et Luck [129] ;

2° L'action du sel sur les phénomènes biologiques est beaucoup moins connue : nous signalerons :

d) Action de NaCl sur les diastases : Duclaux [35], Hahn et Michalik [65], Harding et Van Slyke [139], Van Dam [138] ;

e) Action de NaCl sur les caractères biologiques des organismes : Bachrach et Cardot [5] ;

3° D'autres travaux relèvent des propriétés chimiques de NaCl :

f) Action solubilisante : O. Jensen [75] ;

g) Action sur le pH : Van Dam [138].

Nous examinerons d'abord l'action antiseptique du sel sur le *Penicillium*, l'*Oïdium*, et les ferments du rouge ; nous réservons à la fin de notre travail l'étude du sel au point de vue de son action sur les diastases.

ASPECT DES FROMAGES DIFFÉREMMENT SALÉS. — Dans les haloirs le seul aspect de la croûte moisie suffit à caractériser le salage (uniforme ou irrégulier, quantité de sel exagérée ou suffisante) :

1° Fromages bien salés : la croûte mince est formée d'un léger duvet de Moisissure ; au séchoir la croûte se plisse légèrement ; au creux des sillons ainsi formés les bactéries du rouge apparaissent ; la maturation est normale ; le fromage conserve sa forme ;

2° Fromages exagérément salés : le *Penicillium* forme un feutrage épais ; la croûte ne présente aucune « tripure » ; la maturation est longue ou impossible ;

3° Fromages insuffisamment salés : la croûte d'abord grasse au toucher ne porte aucune trace de *Penicillium* ; un enduit rougeâtre recouvre ces fromages dont la pâte coule.

Il s'agit pour nous de déterminer les flores correspondant à ces différents salages.

Milieux de culture

Comme milieu liquide nous avons choisi le lait stérilisé pendant 1/4 d'heure à 115°.

Les milieux solides comprenaient :

1° De la gélose de Sabouraud dont nous avons précédemment donné la formule. Néanmoins la préparation de ces milieux salés est très délicate. Pour qu'ils se prennent bien en masse nous avons dû supprimer la gélatine et géloser à 3 %. Cependant ces milieux demeurent mous au dessus de 10 % de sel, et une deuxième stérilisation ou un simple chauffage au bain-marie détermine l'hydrolyse des géloses même faiblement salées ;

2° Du caillé a été préparé en coagulant par la présure Hansen le lait chauffé à 28°. Le caillé découpé a été

égoutté sur un filtre de Buchner recouvert d'un papier filtre. On a activé l'égouttage en adaptant ce filtre à une fiole de Kitasato reliée elle-même à une trompe à eau. L'égouttage était arrêté lorsqu'on avait recueilli 650 cm³ de petit lait par litre de lait caillé ;

3° En Normandie nous avons étudié la composition de la flore des fromages blancs, non stériles et salés à des pourcentages variables.

Doses de sel. — Les différents milieux ont reçu : 0-0,5-1-2-3-4-6-8-10-12-14-16-18²-20-30 % de sel. On ajoute directement le sel au lait et à la gélose de Sabouraud. Le caillé trituré avec le sel est stérilisé en boîtes de Pétri à 115° pendant 1/4 d'heure. Tous les milieux ont été stérilisés d'une façon identique.

Conditions de culture. — Après ensemencement très large avec du mycélium sporulé, ou une anse de bactéries, les milieux sont portés à l'étuve réglée à 24°.

1°) Rôle du sel sur la flore fongique

A. — Action sur le *Penicillium*

1° Cultures sur lait : Le sel retarde le développement du *Penicillium*. Dès le 6^e jour les cultures s'arrêtent au delà de 6 % de sel. Au bout d'un mois quelques colonies apparaissent avec 20 % de sel.

La caséine est fortement peptonisée (Sartory [125]).

2° Cultures sur caillé ; le 5^e jour tout le caillé avec 0,5 % NaCl est couvert de *Penicillium* ; avec 4 % quelques colonies seulement apparaissent. Le 11^e jour,

quelques colonies isolées se forment sur le caillé salé à 8 %.

Le caillé se dessèche rapidement à l'étuve ; aucun développement ne se manifeste sur le caillé salé à 10 %. Le sel retarde donc le développement du *Penicillium*.

3° Cultures sur gélose de Sabouraud : le 2^e jour, les cultures couvrent la moitié de la gélose non salée ; le développement est réduit avec 2 % et 3 % de sel ; à peine quelques traînées grisâtres se montrent avec 6 % de sel. Le 3^e jour des colonies se forment avec 8 %, 10 %, 12 % NaCl. Avec de plus fortes concentrations le *Penicillium* se développe péniblement. Après plus d'un mois seulement de culture, le *Penicillium* apparaît sur la gélose salée à 20 % (Photo 1).

Le sel retarde le développement du *Penicillium* mais ne l'arrête qu'à de très fortes concentrations [entre 20 et 30 %].

B. — Action sur l'Oïdium.

1° Cultures sur lait : La teinte du mycélium étant peu tranchée, son développement est difficile à suivre ; de plus le voile tombe souvent dans le liquide. Aussi n'avons-nous tenu compte que des cultures sur milieux solides.

2° Cultures sur caillé : après 48 heures de culture l'Oïdium [a envahi presque tout le caillé non salé ; les colonies se montrent le 3^e jour avec 2 % et 4 % de sel. Une seule colonie apparaît le 4^e jour avec 6 % de sel ;

3° Cultures sur gélose de Sabouraud : Après 24 heures

de culture la gélose sans sel est entièrement recouverte d'*Oïdium* ; le développement est moindre avec 2 % et 3 % de sel, il se réduit à quelques traînées avec 4 % de sel. Le 2^e jour l'*Oïdium* se développe en milieu salé à 6 % (Photo 2 et Fig. 3).

La souche d'*Oïdium* de Langlais [86] donnait aussi de belles cultures sur un milieu salé à 6 %. D'après Fettick [42], l'*Oïdium* ne pourrait proliférer au-dessus de 4 % de sel ; maints auteurs confirment cette limite. La souche de Langlais provenant d'un Brie, et la nôtre prélevée sur un Camembert semblent indiquer, chez les *Oïdium* provenant de fromageries, la faculté de s'adapter à de plus fortes concentrations salines. Cependant il existe un écart considérable entre l'*Oïdium* et le *Penicillium* au point de vue de leur résistance respective au sel : alors que le *Penicillium* peut encore proliférer avec 20 % de sel, 8 % suffisent pour arrêter la croissance de l'*Oïdium*. (Photos 1 et 7).

Flore fongique des fromages blancs.

A l'usine de Coulibœuf (Calvados), nous avons suivi, en même temps que la fabrication d'une date déterminée, la façon dont se comportait le même caillé salé différemment. Au moment du salage, des fromages blancs ont été prélevés et les diverses portions salées à des concentrations croissant de 0,5 à 30 %.

Le caillé trituré avec le sel était façonné en rectangles réguliers sur du papier sulfurisé. En même temps que les fromages de même date, les caillés salés ont été

ensemencés avec des ferments sélectionnés, et portés au haloir. La fermentation des fromages et des caillés s'effectuait ainsi dans des conditions identiques.

Le caillé sans sel s'est couvert d'*Oïdium* dès le 2^e jour de culture ; des examens microscopiques du caillé ont montré le 5^e jour la présence simultanée de l'*Oïdium* et du *Penicillium* avec 1 %, 2 % et 4 % de sel ; jusqu'à 2 % de sel le caillé présente de légers plissements dus à l'*Oïdium*. A mesure que le pourcentage de sel augmente le *Penicillium* prédomine sur l'*Oïdium* dont on ne trouve plus que de rares oïdies avec 8 % de sel.

De même qu'en milieux artificiels stériles, le *Penicillium* prolifère dans le caillé même avec 20 % de sel ; un salage de 8 % suffit à arrêter l'*Oïdium*.

Résistance des levures au salage.

Clayton [23], indique que 4 % de sel arrête le développement des Levures. D'une façon constante les examens microscopiques ont montré la présence de Levures sur le caillé salé à 10 %. Ce fait constitue, avec celui de l'*Oïdium*, un deuxième exemple de l'adaptation particulière au sel des organismes provenant de fromageries.

Dose fromagère de sel.

Les caillés salés avec des quantités croissantes de sel et soumis aux mêmes conditions que les fromages, ont été présentés séparément, à quatre spécialistes. Il s'agissait de fixer quel échantillon portait la croûte

moisie typique qu'on recherche. En tenant compte de l'épaisseur de la couche mycélienne et du goût du caillé, ils ont unanimement conclu que le meilleur salage se trouvait dans les environs de 3 %. Avec 2 % de sel, l'épaisseur de la Moisissure aurait été suffisante, mais la pâte présentait un goût fade ; avec 4 % le fromage aurait été trop salé. Thom indique que le salage du Camembert doit être de 2,5 %, chiffre fort voisin de celui qui a été trouvé. Cette valeur du salage empiriquement déterminée paraît convenir à la plupart des produits laitiers (Gutschy, Clayton [23]).

Dans le Camembert un salage de 3 % permet donc le développement simultané du *Penicillium* (limite 20 %) et de l'*Oïdium* (limite 6 %) ; un salage exagéré élimine uniquement l'*Oïdium*. (Fig. 3).

2° Rôle du sel sur la flore bactérienne

A. — Action sur les ferments lactiques

En milieu alcalin, après 24 heures de culture, la gélose sans sel est entièrement couverte de bactéries ; les cultures s'appauvrissent à mesure que la concentration en sel augmente ; aucun développement ne se manifeste au delà de 4 % de sel. Sur le milieu salé à 6 % les colonies se forment à partir du 4^e jour (Photo 3) ; le développement est maximum avec 1 % de sel.

Sur un milieu acide, en tous points identique à celui où ont été cultivées les Moisissures, les bactéries forment dans les premières 24 heures un léger enduit en

l'absence de sel ; du 3^e au 6^e jour des colonies se montrent sur les géloses salées à 3 % et 4 % (Photo 3).

En milieu alcalin les ferments lactiques peuvent donc supporter jusqu'à 6 % de sel y compris ; en milieu acide ils ne peuvent proliférer au delà de 4 % de sel,

B. — Action sur les bactéries des fromages mal salés.

L'ensemble des bactéries, recouvrant les fromages mal salés, ont été cultivées sur les géloses salées, dans les mêmes conditions que les ferments lactiques. Seul le

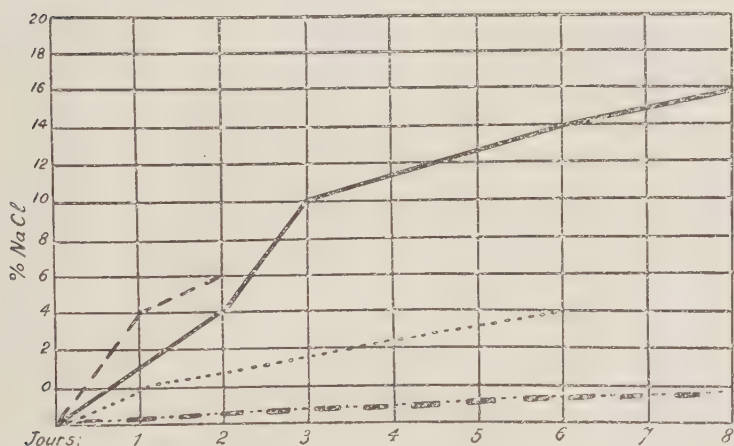


FIG. 3. — Résistance des organismes au sel en milieu acide

Penicillium (—) *Oidium* (---)

Ferments du rouge (.....)

Bactéries du défaut de salage (-.-.-.-)

milieu sans sel permet la formation de rares colonies ; même après plusieurs mois de culture, aucun dévelop-

pement ne s'est manifesté dans les tubes salés de réaction acide. Ces bactéries contrairement aux ferments lactiques ne résistent pas au salage en milieu acide.

RÔLE DU SEL SUR L'ENSEMBLE DE LA FLORE FROMAGÈRE. — Les courbes de résistance au sel des différents organismes montrent qu'un fromage normalement salé (3 %) et acide, offre un milieu favorable au développement de 3 organismes : *Penicillium* (résistance 20 % de sel), *Oïdium* (6 %) et ferments du rouge (4 %). Par contre un tel milieu élimine des espèces bactériennes recouvrant les fromages sans sel.

En salant exagérément les fromages l'*Oïdium* et les ferments lactiques du rouge sont éliminés ; le *Penicillium* forme alors une croûte épaisse.

CHAPITRE II

RÔLE DES SYMBIOSES EN RELATION AVEC LE SALAGE

L'étude des symbioses a fait l'objet de travaux divers : Marshall [98], Gratz [53], Virtanem [141], Rogers [118] ont montré l'action favorisante ou inhibitrice, entre bactéries de différentes espèces. Troili Peterson [137], Barthel [7], Grimmer [57], Goy [52], Dvorak [71], Golding [46], ont étudié l'effet résultant d'associations symbiotiques entre Moisissures et bactéries.

Nous avons cherché à préciser comment se comportaient l'*Oïdium* et le *Penicillium* ensemencés simultanément sur des milieux salés à des pourcentages variables ; nous avons ensuite étudié l'action des ferments lactiques, sur le développement des Moisissures seules, ou en symbiose.

Milieu. — La gélose de Sabouraud ($\text{pH} = 5,3$) préparée comme dans les précédentes expériences, a été salée de 0 à 8 %.

Méthode de culture

Nous avonsensemencé simultanément :

les organismes seuls :

<i>Penicillium</i> sur milieux salés de 0 à 8 %		
<i>Oïdium</i>	»	»
Bactérie	»	»

les symbioses :

<i>Oïdium</i> + <i>Penicillium</i>	»	»
<i>Oïdium</i> + Bactérie	»	»
<i>Penicillium</i> + Bactérie	»	»
<i>Oïdium</i> + <i>Penicillium</i> + Bactérie	»	»

Tous les organismes, seuls ou en symbiose ont été cultivés sur 2 tubes aux pourcentages suivants de sel : 0 %, 2 %, 3 %, 4 %, 6 %, 8 %. Les ensemencements ont tous été effectués d'une façon identique, avec des émulsions dans l'eau stérile de l'organisme ou des symbioses. Après qu'on eut déposé dans chaque tube, à l'aide de pipettes Pasteur stériles, un même nombre de gouttes, les cultures ont été portées à l'étuve à 24°.

Symbiose *Penicillium* + *Oïdium* comparée à *Penicillium* et *Oïdium* seuls

D'une façon constante, l'*Oïdium* seul ou en symbiose se développe, dans les premières 24 heures, jusqu'à 4 % de sel y compris. Le *Penicillium* en culture pure apparaît le 2^e jour jusqu'à 3 % de sel y compris. Mais, en

symbiose avec l'*Oïdium*, son développement est d'autant plus retardé que le milieu est moins salé; tandis que les premières colonies de *Penicillium* percent sur l'*Oïdium* le 2^e jour, avec 3 % de sel, ce n'est que le 3^e jour que les milieux moins salés en sont couverts. Le 4^e jour seulement il apparaît sur le milieu non salé. En pratique, les fromages sans sel ne portent pas la moindre trace de *Penicillium*; on suppose que l'*Oïdium* formant une membrane vivante l'empêche de percer. Pourtant, quelle que soit l'épaisseur de l'*Oïdium*, sur du caillé stérile normal, le *Penicillium* ensemencé en symbiose forme toujours des colonies apparentes. Par contre, avec du caillé provenant de laits altérés et acide, le *Penicillium* même en culture pure ne forme que de rares colonies; en symbiose avec l'*Oïdium* souvent même il ne peut se développer. Aussi, y aurait-il lieu de se demander, si les propriétés dysgénésiques du milieu ne doivent aussi être mises en cause pour expliquer l'absence du *Penicillium* sur certains caillés.

Symbioses *Penicillium* + Bactérie, et *Oïdium* + Bactérie comparées aux Moisissures seules.

Dvorak [72], signale que le *Penicillium* prospère mieux en présence de bactéries lactiques. Notre souche de ferments lactiques du « rouge » ne montre aucune action bien déterminée ni sur l'*Oïdium* ni sur le *Penicillium*.

**Symbiose *Penicillium* + Oïdium + Bactérie comparée
à symbiose *Penicillium* + Oïdium.**

La comparaison de ces deux symbioses est des plus frappantes : le *Penicillium* prédomine toujours dans la symbiose *Penicillium* + *Oïdium* + ferments lactiques. Alors que les bactéries ne semblent favoriser ni l'*Oïdium*, ni le *Penicillium* séparément, elles activent nettement le *Penicillium* quand il est associé à l'*Oïdium*. Le 4^e jour de culture la différence entre les deux symbioses est des plus nettes, surtout en milieu non salé, et salé à 1 % : la symbiose Moisissures + ferments lactiques est entièrement couverte de *Penicillium*; l'*Oïdium* est submergé; ce dernier occupe par contre la presque totalité de la gélose où les Moisissures seules ont été ensemencées; une seule colonie de *Penicillium* s'étend au-dessus de l'*Oïdium*. Les différences entre les symbioses des Moisissures seules, et des Moisissures associées aux ferments lactiques sont moins accusées à mesure que la concentration en sel augmente. L'acidité et le sel gênent les ferments lactiques qui favorisent le *Penicillium*; aussi avec 4 % de sel le *Penicillium* est à peu près aussi abondant dans les symbioses de Moisissures seules et des Moisissures + ferments lactiques. Enfin avec 6 % de sel, les ferments lactiques ne pouvant plus proliférer les deux symbioses sont identiques.

Les ferments lactiques du « rouge » que nous avons isolés accélèrent donc remarquablement le développement du *Penicillium* dans la symbiose *Oïdium* + *Penicillium* + ferments lactiques (Photo 5); comme l'a déjà

signalé Golding [46] pour les fromages à pâte bleue, il y aurait donc lieu pour le Camembert de choisir également avec soin les ferments lactiques dont l'influence sur le développement des Moisissures est parfois très marquée.

CHAPITRE III

RÔLE DE LA RÉACTION DU MILIEU

Un milieu nutritif, aussi riche soit-il en éléments carbonés azotés et minéraux convenablement choisis, peut donner lieu à des cultures misérables si la réaction varie au delà de certaines limites. Les milieux alcalins conviennent aux bactéries ; les Moisissures ont au contraire leur optimum en milieu acide. Dans le caillé, Moisissures et bactéries, aux besoins semble-t-il opposés, se trouvent constamment en présence. L'acidité du caillé étant variable, nous avons cherché à déterminer quelle sélection entraîne la réaction du milieu sur la flore fongique et bactérienne du caillé.

Milieux de culture

Une échelle acide et une échelle alcaline ont été préparées pour le *Penicillium*, l'*Oïdium*, et les ferments lactiques, avec de la gélose de Sabouraud. Pour la série acide nous avons employé de l'acide lactique à trois

titrés différents : décnormal, normal et cinq fois normal.

La série alcaline a été préparée avec de la soude aux mêmes titres. On stérilise préalablement à 115° pendant 1/4 d'heure, les solutions titrées, ainsi que la gélose de Sabouraud neutre, répartie en tubes par portions de 10 cm³. Lorsque les géloses sont légèrement refroidies, on verse à l'aide de pipettes stériles 0,1 cm³ — 0,2 cm³ — 0,4 cm³ — 0 cm³, 6 — 0,8 cm³ d'acide ou d'alcali. L'échelle acide a été poursuivie avec 1 cm³ — 1,2 cm³ — 1,4 cm³ — 1,6 cm³ d'acide lactique 5 fois normal. Nous avons eu ainsi une gamme ininterrompue dont la réaction passait progressivement d'une acidité maxima égale à 16 % d'acide lactique 5 fois normal, à une alcalinité équivalente à 8 % de soude 5 fois normale. Les cultures ont été portées à l'étuve réglée à 24°.

Seuils du *Penicillium*

Dès le 2^e jour, le *Penicillium* s'étend simultanément sur les milieux de réaction acide et de réaction alcaline. Cependant la zone de croissance est beaucoup plus étendue sur l'échelle acide où des colonies apparaissent même avec 2 % d'acide lactique 5 fois normal. Par contre, en milieu alcalin, 1 % de soude normale représente une dose inhibitrice. Le *Penicillium* atteint dès le 4^e jour son seuil en milieu acide, où les dernières cultures apparaissent avec 4 % d'acide lactique 5 fois normal (Photo 6). Le *Penicillium* gravit plus lentement l'échelle alcaline ; le

15^e jour seulement le seuil est porté à 4 % de soude 5 fois normale (Photo 7).

Le *Penicillium* est donc susceptible de proliférer sur des milieux dont la réaction est comprise entre 4 % d'acide lactique 5 fois normal, et 4 % de soude 5 fois normale (Fig. 4).

Cependant l'optimum se place en milieu acide, dans les environs de 4 % d'acide lactique normal.

Seuils de l'Oïdium

Déjà dans les premières 48 heures la zone de croissance de l'Oïdium est beaucoup plus étendue que celle du *Penicillium*. Sur l'échelle acide, des colonies se forment même avec 6 % d'acide lactique 5 fois normal ; sur l'échelle alcaline les cultures s'arrêtent au-delà de 2 % de soude 5 fois normale. Des colonies apparaissent ensuite avec 8 % d'acide lactique 5 fois normal (3^e jour) et 14 % d'acide lactique à la même concentration (20^e jour). Dès lors le seuil en milieu acide est atteint. En milieu alcalin le seuil est porté le 10^e jour à 4 % de soude 5 fois normale (Fig. 4 et Photo 7).

L'Oïdium et le *Penicillium* ont donc même seuil en milieu alcalin : 4 % de soude 5 fois normale ; l'Oïdium l'atteint même 5 jours plus tôt que le *Penicillium*. Cependant, il est généralement admis que l'Oïdium ne peut proliférer en milieu alcalin ; de là on conclut que sur le caillé neutre ou légèrement alcalin l'Oïdium n'est plus à craindre, son activité étant arrêtée automatiquement.

Notre souche bien que présentant un optimum dans les environs de 8 % d'acide lactique normal se développe néanmoins rapidement en milieux alcalins.

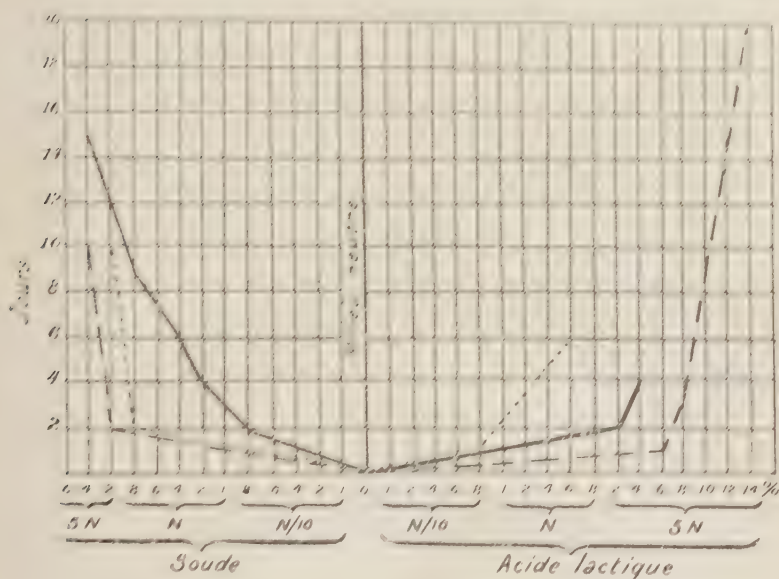


FIG. 4. — Résistance des organismes à l'acidité et à l'alcalinité

Penicillium (—)

Oidium (---), ferments lactiques (....)

Seuils des ferments lactiques

L'examen de la courbe des ferments lactiques met en évidence leur résistance à l'acidité que nous avons déjà signalée. Leur seuil correspond à 6 % d'acide lactique normal. En milieu alcalin le seuil est placé à 2 % de soude 5 fois normale. On ne saurait fixer à la bactérie un

optimum précis ; les cultures sont aussi abondantes avec 8 % de soude normale qu'avec 8 % d'acide lactique décimal.

De l'aspect des courbes précédentes on peut conclure que tout milieu favorable au développement du *Penicillium* convient aussi à l'*Oïdium*. Mais, un milieu très acide (au-delà de 4 % d'acide lactique 5 fois normal) permet seulement la prolifération de l'*Oïdium*. C'est semble-t-il une des raisons pour lesquelles les caillés provenant de laits d'été, toujours acides, se couvrent rapidement d'*Oïdium*. Nous retiendrons aussi que les ferments lactiques du rouge peuvent prospérer dans une zone assez étendue de l'échelle acide. Le *Penicillium*, l'*Oïdium* et les ferments du rouge pourront donc se développer simultanément sur du caillé acide.

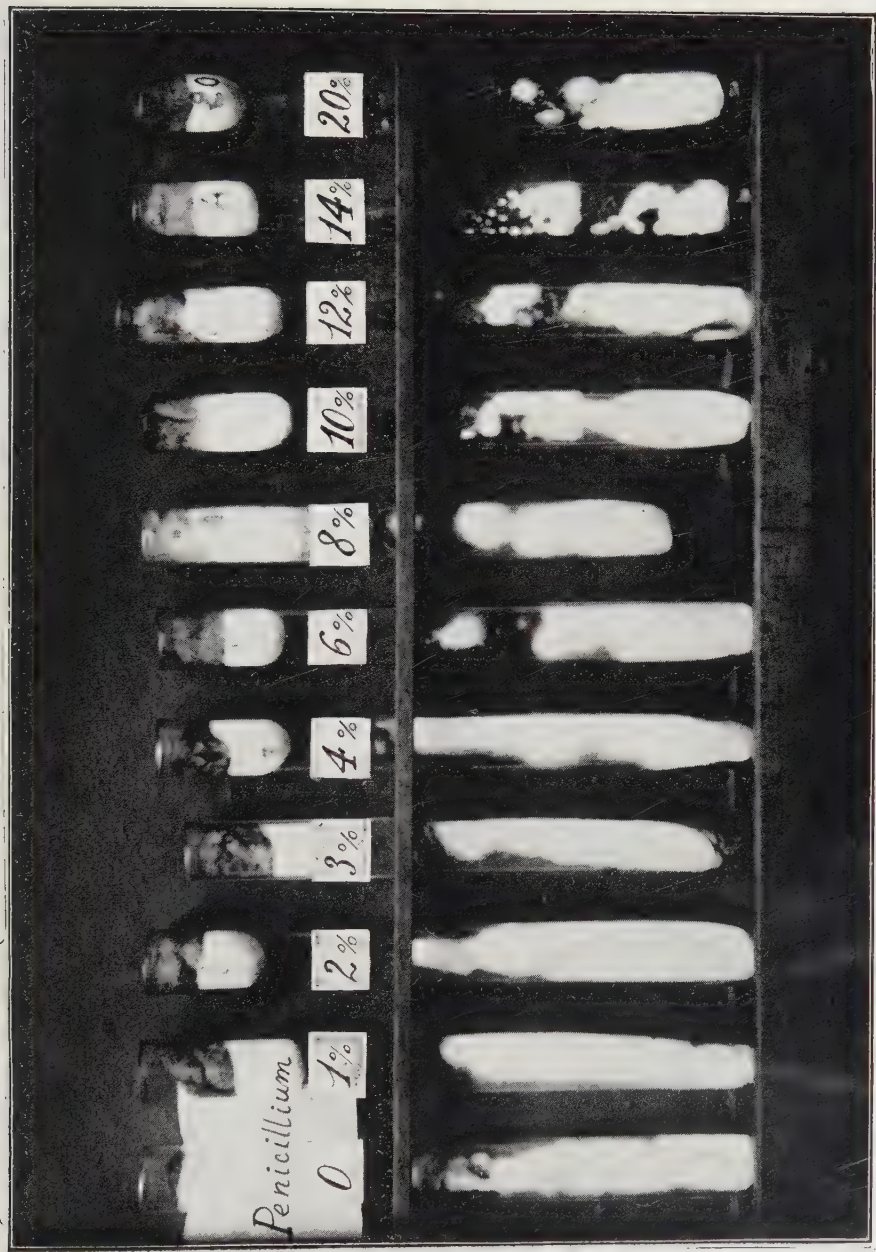
ACTION DE LA TEMPÉRATURE

Le *Penicillium*, l'*Oïdium* et les ferments lactiques supportent mal les hautes températures. Après quelques jours de culture à 38°, les ferments lactiques ne manifestent plus aucune vitalité; l'acidité du laitensemencé qui s'était légèrement accentuée dans les premières 48 heures reste ensuite constante. L'*Oïdium* et le *Penicillium* ne peuvent proliférer sur la gélose de Sabouraud acide maintenue à 38°.

Entre 18° et 27° les Moisissures et les ferments lactiques donnent de belles cultures ; leur développement est d'autant plus rapide, surtout pour l'*Oïdium*, que la température se rapproche de 22°.

Les basses températures entravent le développement des Moisissures aussi bien que des bactéries. L'*Oïdium* cependant est l'élément le plus sensible au froid ; à $+ 4^{\circ}$ les cultures sont retardées de 18 jours environ, tandis que le *Penicillium* ne subit qu'un retard de 9 jours. Les colonies bactériennes sont nombreuses le 9^e jour même en milieu acide.

On peut donc entraver la croissance de l'*Oïdium* en abaissant la température. C'est semble-t-il ce qui dictait le geste empirique des anciens fromagers qui l'été, au lieu de chauffer leur salle de fabrication s'efforçaient au contraire de la rafraîchir. L'aération à laquelle ils avaient recours devait probablement retarder le développement de l'*Oïdium* tout en évitant un salage exagéré. Il était facile dans ces conditions au *Penicillium* et aux ferments du rouge de prendre la prédominance.



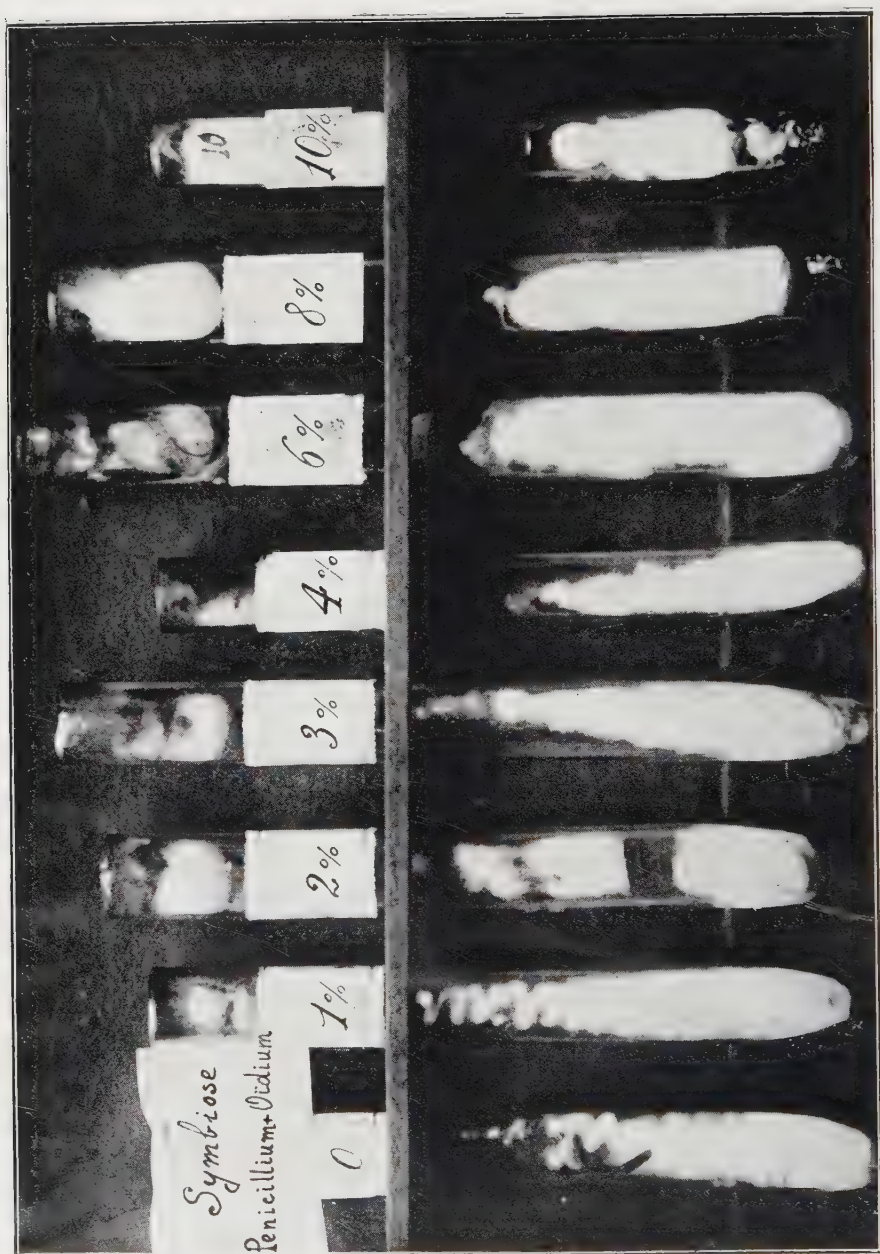
Pl. 1. — Cultures de *Penicillium candidum* sur gélose de Sabouraud salée de 0 à 20 % et datant de 45 jours. Le sel entrave le développement du *Penicillium* dont les cultures sont moins abondantes particulièrement au-dessus de 6 % de sel. Le *Penicillium* se caractérise par sa grande résistance au salage (limite au delà de 20 %).



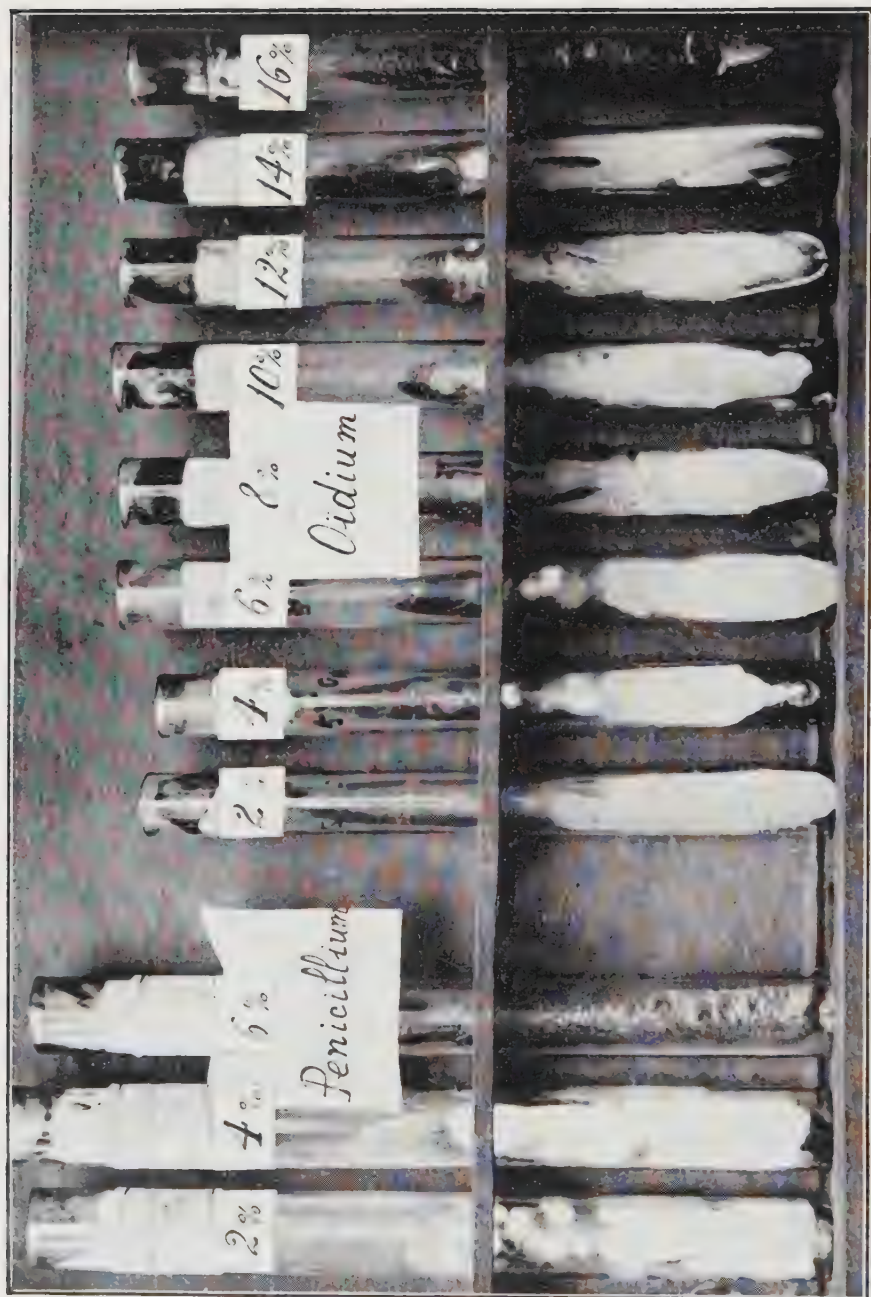
Pl. 2. — Cultures d'*Oidium lactis* sur gélose de Sabouraud salée de 0 à 8 % et datant de 48 h. L'*Oidium* est très sensible au sel, 8 % suffisent à arrêter les cultures, alors que le *Penicillium* peut encore proliférer avec 20 % de sel.



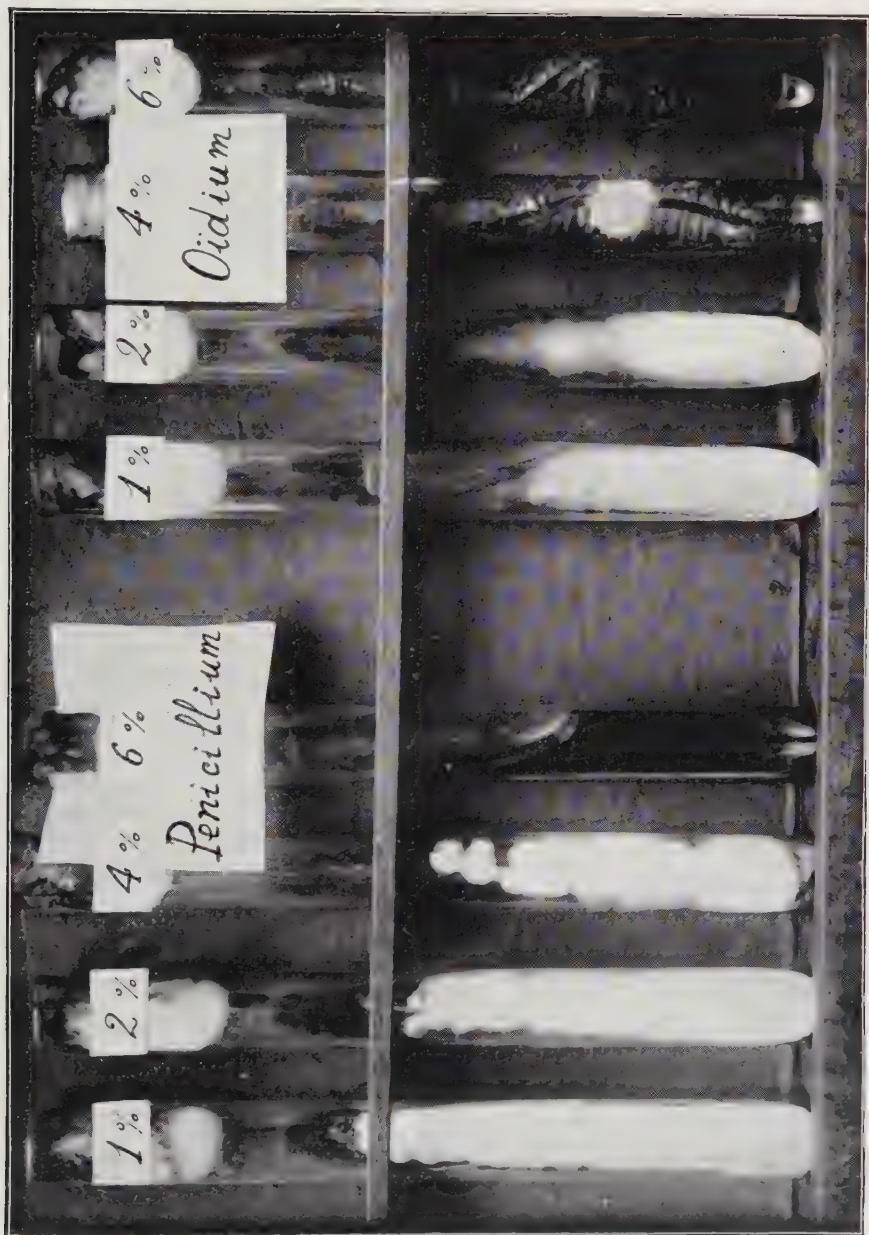
Fig. 1. — Cultures de fermentes les types du group. + sur gelose de Salomont de réaction alcaline et de réaction acide. salée de 0 à 6 %. Ces bactéries peuvent supporter jusqu'à 6 % de sel, y compris, en milieu alcalin, et 4 % de sel en milieu acide. Leur résistance au sel en milieu acide est à noter.



Pl. 4. — Culture de la Symbiose *Penicillium* + *Oidium* sur gélose de Sabouraud acide salée de 0 à 10 %. L'*Oidium* qui prédomine dans le tube sans sel, et salé à 1 %, cède la place au *Penicillium* à mesure que le salage augmente. Au-dessus de 6 % de sel, les cultures de *Penicillium* sont pures.



Pl. 6. — Cultures de *Penicillium* et d'*Oidium* sur milieu neutre additionné de quantités croissantes d'acide lactique 5 fois normal. Les cultures de *Penicillium* s'arrêtent au delà de 4 % d'acide lactique 5 N. L'*Oidium*, plus résistant vis-à-vis des milieux acides, donne des cultures abondantes, même avec 14 % d'acide lactique 5 fois normal.



Pl. 7. — Cultures de *Penicillium* et d'*Oidium* sur milieu neutre additionné de quantités croissantes de soude 5 fois normale. Les deux moisissures ont même seuil : 4 o/o de soude 5 fois normale.

TROISIÈME PARTIE

EFFETS DE L'ACTIVITÉ DES ORGANISMES SUR LE MILIEU

Cette Partie est réservée à l'étude des transformations du milieu par le *Penicillium*, l'*Oïdium*, les ferments lactiques et leurs symbioses. Nous examinerons d'abord l'action des organismes sur la réaction du milieu et sur les sucres. Nous étudierons ensuite l'effet des diastases, et quelques aspects de l'attaque de la caséine.

CHAPITRE PREMIER

1. ACTION SUR LA RÉACTION DU MILIEU

A du petit lait provenant de la coagulation du lait par la présure, nous avons ajouté des indicateurs : de la teinture de tournesol à raison de 15 %, ou des colorants

du pH, des échelles de Clark et Lubs, en quantité indiquée par les auteurs.

La zone de virage des indicateurs employés s'étendait depuis $\text{pH} = 3,0$ à $\text{pH} = 9,6$. Ces colorants n'avaient aucun effet toxique sur les cultures; mais celles-ci, modifiant le rouge de méthyle, toute variation comprise entre $\text{pH} = 4,4$ et $\text{pH} = 6$ passait inaperçue. Aussi dans une 3^e expérience les indicateurs ont été supprimés. Le pH des cultures a été pris régulièrement suivant la technique habituelle de Clark et Lubs.

Conditions de cultures. — Les milieux stérilisés à 115° pendant $1/4$ d'heure sont ensemencés et portés à l'étuve à 24° .

Action du *Penicillium*

Cette Moisissure acidifie d'abord le milieu qui passe de $\text{pH} = 6$ à $\text{pH} = 5,8$; il atteint ensuite $\text{pH} = 4,8$ le 6^e jour et s'y maintient jusqu'au 11^e jour. Le milieu se neutralise ensuite progressivement, puis brusquement, devient alcalin avec $\text{pH} = 8,8$ le 20^e jour. Le *Penicillium* acidifie d'abord les milieux puis les alcalanise (fig. 5).

Action de l'*Oïdium*

Le milieu devient immédiatement et très rapidement alcalin avec l'*Oïdium*. Avec un milieu de pH initial égal à 5,2 nous avons obtenu $\text{pH} = 9$ le 8^e jour. L'alcalinisation peut être encore plus rapide (voir la courbe de l'alcalinisation des milieux par l'*Oïdium*) (Fig. 5). Le milieu

de $\text{pH} = 6$ passe le 5^e jour à $\text{pH} = 8$ et atteint $\text{pH} = 9$ le 7^e jour.

D'après ces expériences l'*Oïdium* apparaît comme un organisme alcalinisant. Rullmann [121] affirmant que

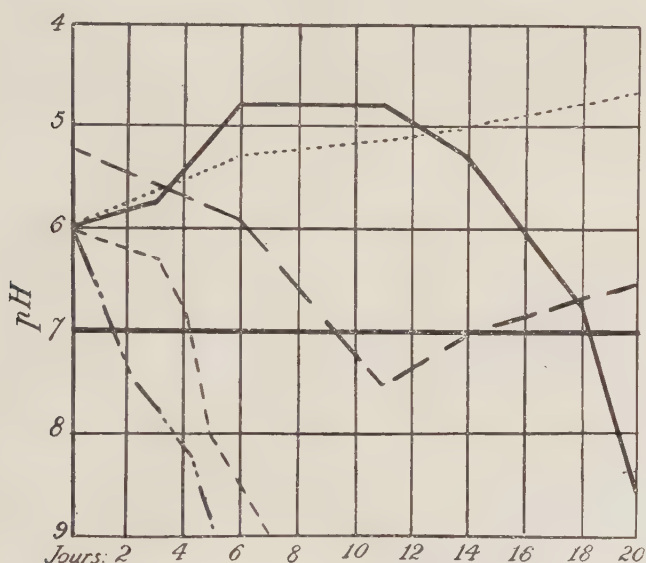


FIG. 5. — Variations du pH des cultures de *Penicillium* (—), *Oïdium* (---), ferments lactiques du rouge (.....), bactéries du défaut de salage (- .), symbiose *Penicillium* + *Oïdium* (— — —).

l'*Oïdium* acidifie le lait stérile, nous avons tenu à contrôler sur ce même milieu les propriétés alcalinisantes de notre souche d'*Oïdium*.

Dosage de NH^3 formé par l'*Oïdium* dans le lait

Du lait réparti en fioles d'Erlenmeyer par portions de 10 cm³, a été stérilisé à 115° pendant 1/4 d'heure ; (cultures à 24°). NH^3 est dosé par le procédé de Schlœsing. On déplace NH^3 à l'aide du lait de chaux ; l'alcali se combine à une quantité connue de SO^4H^2 titré. On dose par la soude SO^4H^2 resté libre. Quelques dosages sont d'abord effectués sur du lait stérile.

Le laitensemencé d'*Oïdium* dégage une quantité de NH^3 équivalente à 0 cc. 15 de SO^4H^2 N/10. le 3^e jour.

Le 5^e jour NH^3 formé correspond à 0 cm³. 85 de SO^4H^2 N/10. Notre souche d'*Oïdium* alcalinise donc le lait stérile. En ajoutant au caillé des colorants du pH (4 cm³. de colorant pour 10 gr. de caillé) on peut s'assurer que l'*Oïdium* alcalinise immédiatement le caillé stérile comme tous les autres milieux ; il s'oppose ainsi au *Penicillium* qui acidifie d'abord les milieux et ne les alcalinise que tardivement (Fig. 5).

Action des ferments lactiques

Le milieu s'acidifie et passe de pH = 6,04 à pH = 5,3 le 6^e jour. Le 11^e jour pH = 5,1 ; le milieu atteint pH = 4,6 le 20^e jour seulement. Les ferments lactiques du rouge sont donc faiblement acidifiants, ce qui confirme l'attaque très lente du lactose par ces bactéries.

Action des bactéries prélevées sur un fromage insuffisamment salé

Le milieu présente très rapidement une réaction alcaline. La teinture de tournesol est décolorée dès le 3^e jour ; aucun des autres organismes n'attaque cet indicateur. Dès le 2^e jour les cultures passent de $\text{pH} = 6$ à $\text{pH} = 7,4$; elles atteignent $\text{pH} = 9$ le 5^e jour. Ces bactéries sont donc nettement alcalinisantes.

Action des symbioses

Les symbioses alcalisent les milieux rapidement sous l'influence de l'*Oïdium* ; mais dès que le *Penicillium* se développe, l'alcalinisation devient très lente ; parfois même, ainsi que l'indique la courbe de la symbiose *Penicillium* + *Oïdium* le milieu redevient acide (Fig. 5).

Des faits de même ordre semblent se reproduire dans les fromages. Du 2^e au 5^e jour l'acidité diminue, le pH passe de 4,3 à 6,2. Mais, dès que le *Penicillium* se développe l'alcalinisation subit un brusque arrêt ; le pH semble demeurer presque constant ; du 5^e au 12^e jour il passe à peine de $\text{pH} = 6,2$ à $\text{pH} = 6,5$. Il semble bien que pendant cette période l'acidification due au *Penicillium* s'oppose à l'alcalinisation déterminée par l'*Oïdium*, et que ces réactions de sens contraire s'annulent. Si le *Penicillium* prédominait sur l'*Oïdium*, l'acidité de la pâte pourrait même augmenter ; Mesnil [105] a précisément constaté une forte acidité au moment où le *Penicillium*

atteint son développement maximum. Les fromages insuffisamment salés ne portant pas de *Penicillium*, s'alcalinisent très rapidement, $\text{pH} = 8,5$, le 12^e jour au lieu de $\text{pH} = 6,5$ pour les fromages bien salés couverts de *Penicillium* et d'*Oïdium*.

L'*Oïdium* en alcalinisant le caillé prépare le terrain au développement des bactéries : ces bactéries sont alcalinisantes en l'absence de *Penicillium* ; ce sont au contraire des ferments lactiques du rouge résistant à l'acidité qui prédominent sur un fromage recouvert à la fois d'*Oïdium* et de *Penicillium*.

Par la réaction qu'elles déterminent les Moisissures sélectionnent donc la flore bactérienne des fromages.

Rôle du pH initial sur la réaction déterminée par les Moisissures

Nous avons recherché si l'*Oïdium* et le *Penicillium* se comportent d'une façon identique dans des milieux de réaction acide ou de réaction alcaline.

Les Moisissures ont étéensemencées sur du petit-lait ajusté aux pH suivants : $\text{pH} = 6,4 - 7,2 - 8 - 8,3$ (stérilisation et conditions de culture identiques à celles des expériences précédentes). Le *Penicillium* acidifie indifféremment les milieux de réaction acide ou alcaline. Le milieu de $\text{pH} = 6,4$ passe à $\text{pH} = 5,8$ le 4^e jour. En milieu alcalin le pH varie de 7,2 à 6,2 le 8^e jour. Le milieu de pH initial égal à 8, atteint $\text{pH} = 6$ le 5^e jour.

L'*Oïdium* alcalinise avec une très grande rapidité les

milieux acides. Les phénomènes sont tout autres en milieu alcalin où l'*Oïdium* acidifie toujours les cultures ; le pH passe de 8 à 6,8. Mais, fait essentiel à remarquer, cette acidification est de très courte durée ; après 24 h. le milieu s'alcalinise et atteint pH = 8,4.

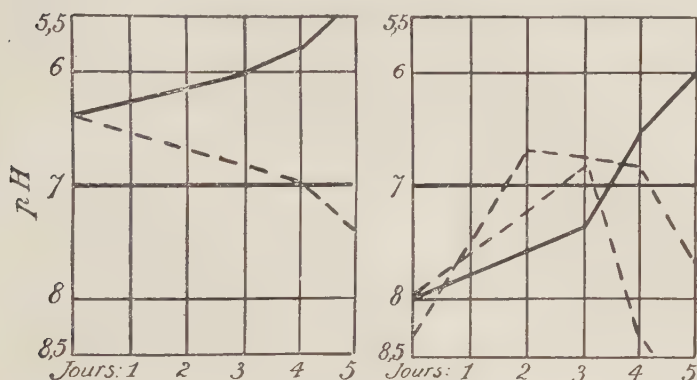


FIG. 6

Variations
du pH en milieux acides

Variations
du pH en milieu alcalin

Penicillium (—), *Oïdium* (- - -)

Avec les milieux ajustés à pH = 7,2 et pH = 8,3 l'acidification déterminée par l'*Oïdium* se maintient quelques jours (Fig. 6).

Le *Penicillium* acidifie donc tous les milieux indépendamment de leur pH initial. L'*Oïdium* est au contraire un alcalinisant énergique ; mais, sur des milieux de pH alcalin, une acidification de très courte durée précède l'alcalinisation.

Les variations du pH du caillé dépendront donc :

1° De la nature de la flore : L'*Oïdium* et les bactéries du défaut de salage sont alcalinisants ; les ferments lactiques et le *Penicillium* acidifient le milieu ; ce dernier amène secondairement une réaction alcaline ;

2° Du pH du milieu : Le sens et la vitesse de ces changements de réaction sont parfois fonction du pH initial du milieu.

2° RAPPORT ENTRE LA CONSOMMATION DU SUCRE ET LA RÉACTION DU MILIEU

Dans différentes expériences nous avons cherché à suivre la relation entre l'attaque du lactose par les organismes et le pH des cultures. Du liquide de Sabouraud, lactosé à 5 % et réparti par portions de 20 cm³ dans des fioles d'Erlenmeyer, a été stérilisé à 115° pendant 1/4 d'heure. Des ensemencements très larges à l'aide de véritables boutures de Moisissure activent le développement du *Penicillium* toujours très lent en milieu liquide. Sur les cultures maintenues à 24° on fait les déterminations suivantes :

1° Réaction du milieu : recherche du pH d'après la méthode de Clark et Lubs ;

2° Dosage du lactose consommé d'après la méthode de Bertrand. On recueille la totalité du milieu de culture

en décantant au préalable le mycélium sur un petit entonnoir garni de deux filtres tarés et superposés. Afin de recueillir toutes les traces de sucre on lave à l'eau distillée le mycélium, et les tubes où a été déterminé le pH des cultures. Avec ces eaux de lavage on complète à 200 cm³ le volume du milieu de culture. On effectue le dosage du lactose sur 10 cm³ de cette dilution qui représentent 1 cm³ de milieu primitif. Bertrand recommande en effet d'opérer le dosage sur 20 cm³ de solution renfermant au plus 90 mg. de sucre. En ajoutant aux 10 cm³ de la dilution, 10 cm³ d'eau distillée on se trouve dans les conditions prescrites par l'auteur ;

3° Pesée des récoltes : le mycélium lavé est desséché pendant 24 h. à l'étuve à 100°. Après refroidissement dans un dessiccateur, on le pèse.

Consommation du lactose par le *Penicillium*

Le tableau suivant met en évidence la destruction progressive du lactose par la Moisissure ; parallèlement le milieu s'acidifie et passe de pH = 4,8 à pH = 4,4 (8^e jour). Dès le 15^e jour le milieu se neutralise ; il passe à l'alcalinité le 18^e jour (pH = 8,8) ; dès lors on ne peut plus déceler dans le milieu la moindre trace de lactose.

Le Penicillium apparaît donc comme un gros destructeur de lactose ; l'attaque du sucre détermine l'acidification rapide du milieu ; celui-ci ne passe à l'alcalinité que lorsque tout le lactose a été consommé (Fig. 5).

TABLEAU 1. — Cultures du *Penicillium* sur Sabouraud lactosé

Jours	pH	LACTOSE		RÉCOLTES	OBSERVATIONS
		restant	consommé		
0	4,8	44,5 mg.			
8	4,4	40 »	4,5 mg.	90 mg.	Une couronne blanche.
9	4,4	26 »	18,5 »	155 »	Ilots blancs. Masses gélatineuses.
10	4,4	21,5 »	23 »	200 »	Presque entièrement couvert. Spores.
15	5,6	6,5 »	38 »	260 »	Epaisse couche mycélienne.
16	6,2	2,7 »	41,8 »	300 »	Mycélium légèrement rosé.
18	8,8	0 »	44,5 »	304 »	id.
30	9	0 »	44,5 »	306 »	id.

Consommation de lactose par l'*Oïdium*

Les cultures sur Sabouraud sont très misérables ; aussi n'en a-t-il pas été tenu compte. L'*Oïdium* prospérant mieux sur le petit lait, les cultures sont effectuées sur ce milieu. On élimine par chauffage à feu nu, stérilisation et filtration, les protéines coagulables par la chaleur. La concentration du petit lait explique sa forte teneur en lactose (77 mg. par centimètre cube).

TABLEAU 2. — Cultures d'*Oidium* sur petit lait

Jours	pH	LACTOSE		RÉCOLTES	OBSERVATIONS
		restant	consommé		
0	4,6	77 mg.			
2	6,4	73 »	4 mg.	38,5 mg.	Voile épais.
3	8,4	72 »	5 »	45 »	»
5	8,8	71 »	6 »	92,5 »	»
6	9	67 »	10 »	104,5 »	»
9	9	64 »	13 »	84 »	Voile dissocié.
15	9	63,5 »	13,5 »	74,5 »	»

Après 48 heures de culture le milieu est déjà partiellement neutralisé ; le pH est passé de 4,6 à 6,4 ; une faible quantité de lactose a été consommée (4 mg.). Le milieu alcalin dès le 3^e jour (pH = 8,4) passe à pH = 8,8 le 5^e jour et atteint pH = 9 le 6^e jour ; il reste encore dans le milieu 67 mg. de lactose par centimètre cube. L'alcalinisation des milieux par l'*Oidium* est donc immédiate et n'a aucun rapport avec la teneur en sucre du milieu.

Ce caractère l'oppose au *Penicillium* qui n'alcalinise les milieux que lorsqu'il en a épuisé tout le sucre (Fig. 7).

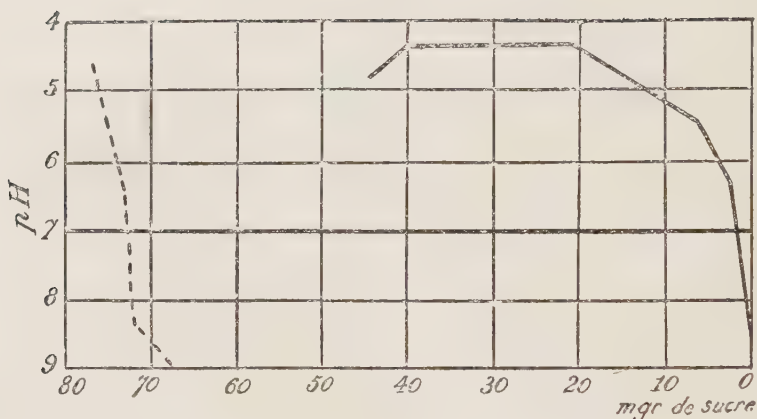


FIG. 7. — Variations du pH en fonction du sucre restant dans le milieu

Penicillium (—). *Oidium* (— — —)

Consommation du lactose par les symbioses

Sur des cultures de petit lait en tous points identiques, nous avons obtenu les résultats suivants le 20^e jour.

Symbiose *Penicillium* + *Oidium* : pH = 6,34 — lactose restant : 12 mg.

Oidium pH = 9 lactose ; restant : 33 mg.

Penicillium pH = 8,01 ; aucune trace de lactose.

Tandis qu'en culture pure les Moisissures ont alcalinisé profondément le milieu, en symbiose elles maintiennent le milieu acide (pH = 6,34). Ces faits s'expliquent aisément : le développement du *Penicillium* est

limité par l'*Oïdium* dans la symbiose ; aussi reste-t-il une réserve de sucre (12 mg.) ; le *Penicillium* en l'utilisant acidifie le milieu.

Action des organismes sur les milieux privés de sucre

A 100 cm³ d'eau on ajoute 2 gr. de peptone et 10 cm³ d'acide lactique N/10. Les milieux sont stérilisés à 115° pendant 1/4 d'heure. Après ensemencement ils sont portés à l'étuve à 24°.

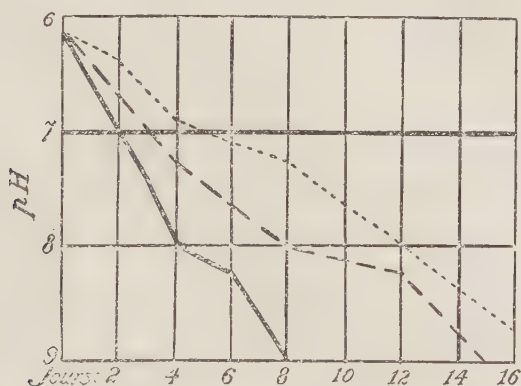


FIG. 8. — Variations du pH des cultures sans sucre

Penicillium (—)

Oïdium (- - -), ferments lactiques du rouge (· · ·)

Le *Penicillium*, l'*Oïdium* et les ferments lactiques du rouge alcalinisent simultanément les milieux sans sucre. Mais, alors qu'en milieu sucré l'*Oïdium* est un alcali-

linisant énergique et rapide ($\text{pH} = 9$ le 6^e jour) il devient par contre un alcalinisateur plus faible en l'absence de sucre (fig. 8).

Le *Penicillium* alcalinise plus rapidement les milieux que les ferments lactiques du rouge et que l'*Oïdium*.

La teneur des fromages en lactose est une question des plus discutées. D'après Orla-Jensen tout le lactose serait transformé en acide lactique après quelques jours de fabrication ; pour d'autres, le fromage mûr renfermerait du lactose non attaqué. Cette question présente pour le Camembert une particulière importance, car, aussi longtemps que le lactose subsiste le *Penicillium* et les ferments lactiques du rouge acidifient le milieu.

La durée de neutralisation du caillé dépendra donc tout autant :

1^o De l'égouttage et de l'activité de la fermentation lactique qui règlent la teneur de la pâte en lactose ; (tous les organismes alcalinisent le caillé dès que le sucre est épuisé) ;

2^o De la flore : même en présence de lactose, l'*Oïdium* et les bactéries du défaut de salage alcalinisent le milieu.

CHAPITRE II

DES DIASTASES SÉCRÉTÉES PAR LES ORGANISMES

La nature et le rôle des ferments sécrétés par les organismes sont des plus variés. Nous nous sommes bornée à rechercher pour les Moisissures et les bactéries lactiques, les ferments oxydants et les ferments réducteurs.

I. — Identification des oxydases et des réductases

1° *Recherche des oxydases.* — Certaines substances telles le naphтол α , le gaïacol, le pyrogallol, le chlorhydrate de naphtylamine α , oxydées par les ferments changeant de teinte. Pour rechercher les ferments oxydants nous avons ajouté à 10 cm³ de milieu stérile et liquéfié, 1 goutte (mesurée au compte-goutte normal) de solution de gaïacol (0 gr. 50 pour 100 d'eau stérile). Les Moisissures ont été ensemencées sur du milieu de Czapeck et sur du petit lait, et les bactéries sur du milieu de Sabou-

raud et du petit lait. Les cultures ont été effectuées à la fois sur ces milieux de réaction acide et alcaline. Tous nos milieux ont été gélatinés à 15 % et stérilisés à 110° pendant une demi-heure. Après addition de gaïacol les milieux sont solidifiés en position inclinée. Les cultures sont conservées à la température ordinaire.

Le gaïacol retarde de 4 à 5 jours l'apparition des Moisissures; ensuite le développement est aussi abondant que dans les témoins sans gaïacol. Les ferments lactiques ne subissent aucun retard. Après plus d'un mois de culture la teinte du milieu n'a pas été modifiée, ce qui ne permet pas de supposer l'élaboration de ferments oxydants par les Moisissures et les ferments lactiques.

2° *Recherches des réductases.* — Elle repose sur la réduction du bleu de méthylène en leucobase incolore. A 5 cm³ de lait on ajoute 1 goutte (mesurée au compte-goutte normal) de solution de bleu de méthylène à 1 %. On stérilise à 115° pendant 1/4 d'heure. Les résultats suivants se rapportent à des cultures maintenues à 24°.

PENICILLIUM. — La décoloration du bleu de méthylène est lente et incomplète; le 12^e jour le milieu présente une teinte vert de gris correspondant à un produit de réduction intermédiaire: le Vert de Bindschädler. Le milieu se recolore en bleu le 20^e jour. Par la suite le bleu de méthylène est à nouveau réduit partiellement puis réoxydé.

OÏDIUM ET FERMENTS LACTIQUES DU ROUGE. — Ils réduisent très rapidement le bleu de méthylène en leucobase incolore (*Oïdium* 3^e jour; ferments lactiques 5^e jour). La réoxydation qui s'annonce le 20^e jour est très lente et incomplète.

Les Moisissures et les ferments lactiques élaborent donc des réductases ; mais celles-ci diffèrent entre elles :

1° Par leur activité : la réduction du bleu de méthylène s'opère successivement avec les organismes suivants : *Oïdium*, ferments lactiques, *Penicillium* ; la réoxydation est d'autant plus rapide dans l'ordre inverse ;

2° Par les produits de réduction : l'*Oïdium* et les ferments lactiques seuls réduisent le bleu de méthylène en leucobase incolore ;

3° Par les produits de réoxydation : seul le *Penicillium* réoxyde complètement le bleu de méthylène.

La réoxydation plus ou moins complète du bleu de méthylène laisse supposer l'intervention de ferments oxydants dans certaines conditions de milieu. Sans doute doit-on attribuer à ces produits de réduction et d'oxydation, la saveur et le bouquet des fromages. Il semble d'ailleurs qu'une certaine analogie pourrait être établie entre la maturation des fromages et la maturation des vins. Au cours de la vinification les réductions sont intenses ; les phénomènes d'oxydation semblent intervenir particulièrement dans la formation du bouquet. Mais, des espèces d'organismes nettement déterminées concourent à imprimer aux vins leur bouquet spécifique. Dans les fromages les réductions et les oxydations dont semble dépendre le bouquet varient profondément avec la flore. Celle-ci n'étant pas toujours identique à elle-même, il n'est nullement surprenant de constater une certaine variabilité dans les caractères organoleptiques de la pâte.

II. — Influence du milieu sur les réductases

Dans le caillé les organismes évoluent dans un milieu dont la réaction et la composition sont variables. Nous avons recherché :

- 1° Si la nature du sucre avait une influence sur la réduction du bleu de méthylène ;
- 2° Le rôle de la réaction du milieu ;
- 3° Le rôle du sel.

1° Rôle des sucres.

Dans de l'eau peptonée à 2 ‰, nous avons dissous, séparément, à la dose de 3 ‰, les sucres suivants : saccharose, glucose, lactose, galactose. A 5 cm³ de milieu on ajoute 1 goutte de solution à 0 gr. 50 ‰ de bleu de méthylène. Les milieux sont stérilisés à 120° pendant 1/4 d'heure. Cultures à 24°.

La vitesse de réduction du bleu de méthylène dépend de la nature du sucre ; elle est rigoureusement parallèle à l'attaque des sucres par les ferments lactiques et s'effectue dans l'ordre suivant : galactose, glucose, lactose, saccharose.

De là l'obligation pour nos milieux de choisir comme sucre le lactose, élément énergétique du caillé.

Milieux pour l'étude des facteurs modifiant l'activité des réductases.

Nous avons étudié simultanément l'influence :

- 1° De la composition du milieu (réaction, teneur en sel) ;

2° De la composition de la flore (symbioses) ;
sur la réduction du bleu de méthylène par les Moisissures
et les ferments lactiques.

Nous indiquerons donc en une seule fois la préparation
de tous les milieux :

a) Le substratum. Lesensemencements ont été faits :

1° En milieu naturel liquide : petit lait à la présure débar-
rassé d'albumine (voir p. 82) ;

2° En milieu artificiel solide : Gélose de Sabouraud lac-
tosée à 4 % ;

b) La réaction. Une partie des milieux était acide $\text{pH} = 6,4$, une partie a été alcalinisée et ramenée $\text{pH} = 8$;

c) Dose de sel. On ajoute 2 %, 4 %, 6 % de sel ; ce dernier
pourcentage n'est jamais atteint dans le Camembert ;

d) Solution de bleu de méthylène. A 5 cm³ de milieu on
ajoute 1 goutte (mesurée avec un compte-goutte normal) de
solution de bleu de méthylène à 0 gr. 50 % ;

e) Colorants du pH. Aux témoins sans sel, ni bleu de mé-
thylène nous avons ajouté des colorants du pH : du bromo-
crésol pour la série acide ; du rouge de phénol pour la série
alcaline (quantité de colorant correspondant aux échelles
de Clark et Lubs).

Le Sabouraud est gélosé à 3 % ; après stérilisation à 115°
pendant 1/4 d'heure les géloses sont solidifiées en position
verticale.

COMPOSITION DES SÉRIES. — Les milieux liquides aussi
bien que solides, de réaction acide ou alcaline com-
prennent respectivement 5 séries ainsi composées :

1^{re} Série : milieu seul ou additionné de colorants du pH
(milieux liquides) ;

2^e Série : milieu + bleu de méthylène ;

3^e Série : milieu + bleu de méthylène + 2 % NaCl ;

4^e Série : milieu + bleu de méthylène + 4 % NaCl ;

5^e Série : milieu + bleu de méthylène + 6 % NaCl ;

Dans chaque série nous avons cultivé à l'étuve à 24°, le *Penicillium*, l'*Oïdium* et les ferments lactiques du rouge seuls et en symbiose dans 2 tubes à la fois.

Remarques. — En milieu liquide et alcalin, le *Penicillium* forme d'abord des colonies en anaérobiose ; celles-ci étoilent la paroi du tube où elles se fixent de préférence ; après 5 jours le *Penicillium* forme quelques îlots en surface.

Le bleu de méthylène retarde de 3 à 4 jours le développement des Moisissures et des ferments lactiques ; mais dès qu'ils commencent à proliférer en milieu liquide, ils réduisent toujours le bleu de méthylène en profondeur. La décoloration gagne progressivement la surface.

La réduction du bleu de méthylène est en tous points identique en milieu artificiel (Sabouraud) et en milieu naturel (petit-lait).

2^e Rôle de la réaction du milieu.

ACTION SUR L'OÏDIUM ET LES FERMENTS LACTIQUES. — Aux pH où nous avons opéré la réduction du bleu de méthylène est aussi rapide en milieu alcalin qu'en milieu acide.

ACTION SUR LE PENICILLIUM. — La réaction alcaline favorise la réduction du bleu de méthylène qui est

presque totale le 8^e jour en milieu solide ; le feutrage est beaucoup plus épais en milieu acide mais la réduction est plus tardive (15^e jour).

Il en est de même en milieu liquide : le 23^e jour la réduction est nette en milieu alcalin salé ou non salé ; le 30^e jour seulement elle s'annonce en milieu acide malgré un développement abondant de *Penicillium*.

L'activité des réductases du *Penicillium* n'est donc pas proportionnelle à la masse mycélienne ; un développement très limité en milieu alcalin suffit à réduire le bleu de méthylène ; l'activité des réductases de la Moisissure est donc sous la dépendance étroite du pH du milieu.

Il semble donc que la flore superficielle du caillé en modifiant la réaction peut régler l'intensité des phénomènes diastasiques.

3^o Rôle du sel.

OÏDIUM ET FERMENTS LACTIQUES DU ROUGE. — La réduction du bleu de méthylène est d'autant moins rapide que le salage augmente. Le 8^e jour en l'absence de sel l'*Oïdium* a réduit entièrement le bleu de méthylène ; les milieux salés présentent à peine une série de tons verts. Il en est de même pour les ferments lactiques. Le développement limité de ces organismes en milieu salé entraîne, semble-t-il, une réduction moins profonde du bleu de méthylène.

PENICILLIUM. — Les milieux alcalins ne montrent aucune action bien déterminée de NaCl. Le bleu de

méthylène est réduit aussi rapidement en milieu salé qu'en milieu non salé.

Dans les milieux solides de réaction acide, le développement du *Penicillium* est très abondant en l'absence de sel; cependant le bleu de méthylène est intact. Les mycélium sont moins denses en milieu salé, mais le bleu de méthylène est partout réduit. Le 15^e jour le contraste est encore plus frappant : dans tous les tubes salés sans exception le bleu de méthylène est réduit; seul le tube sans sel ne montre la moindre réduction. En milieu liquide les phénomènes sont identiques : en milieu salé la réduction est nette le 20^e jour; le 30^e jour seulement le milieu sans sel présente une réduction très légère du bleu de méthylène.

Le sel entrave le développement du *Penicillium*; par contre il augmente considérablement, en milieu acide, l'activité des ferments réducteurs; ce phénomène qui paraît relever de la catalyse semble de même nature que ceux observés par Van Dam [138], à savoir que le sel, qui entrave la coagulation, active la digestion de la paracaséine par la chymosine.

Le rôle du sel sur les phénomènes diastasiques est de beaucoup le moins étudié. D'après Van Slyke, Harding et Hart le sel retarderait la maturation. Il nous semble cependant qu'étant donné son action activante sur les diastases, il peut intervenir indirectement dans la maturation.

4^e Rôle des symbioses.

D'une façon constante la réduction du bleu de méthylène est très rapide avec les symbioses. Le 15^e jour de culture la réduction est incomplète avec les Moisissures, et les ferments lactiques en culture pure. Le bleu de méthylène est entièrement réduit avec la symbiose *Penicillium* + *Oïdium* ; avec la symbiose *Penicillium* + *Oïdium* + ferments lactiques la décoloration est totale dès le 4^e jour.

En milieu acide ou alcalin, salé ou non salé, les réductases bactériennes et fongiques acquièrent par leur simple juxtaposition une très grande activité.

La réaction du milieu, le salage, les symbioses sont susceptibles de faire varier l'activité des réductases. Dans la pratique fromagère on ne peut modifier ni la flore du lait ni son acidité ; le salage dont nous avons signalé l'importance est exécuté à la main ; l'égouttage dont dépendra l'acidité de la pâte est déterminé empiriquement ; aussi que de tâtonnements et de subterfuges pour conduire la fermentation ! Ces faits, rapprochés de nos observations, expliquent, dans une certaine mesure, la variabilité de la maturation qu'on observe journellement dans la pratique.

CHAPITRE III

L'ATTAQUE DE LA CASÉINE ET LA MATURATION

La maturation du Camembert débute au moment où des bactéries présentant une pigmentation rouge succèdent aux Moisissures. L'apparition du « rouge » étant le critérium d'une bonne maturation, le seul souci des praticiens est d'amener les fromages à prendre le rouge en temps opportun.

Déterminer les agents de la maturation revient donc à préciser quels sont les organismes qui préparent aux ferments du rouge un terrain favorable. Nous nous efforcerons de reproduire en quelque sorte synthétiquement du rouge sur le caillé stérile.

La pigmentation des ferments du « rouge ». — Les ferments lactiques pigmentés en rouge sur les fromages ne présentent sur le caillé stérile la moindre coloration ; celle-ci n'a pu être observée qu'une seule fois en culture pure : le caillé stérile d'un tube à essai a été surmonté d'une émulsion dans l'eau de ferments lactiques ; après plus d'un an de culture l'eau présentait une teinte

uniformément rougeâtre. Les ferments lactiques ne sont donc chromogènes que dans certaines conditions de milieu.

Rôle des symbioses sur la formation du rouge

Sur les fromages normalement salés, les ferments du rouge se développent à la suite des Moisissures. Il semble donc tout indiqué de faire appel aux symbioses de Moisissures et de ferments lactiques pour obtenir du rouge sur du caillé stérile.

Milieu : Du caillé à la présure est stérilisé en tubes à 115° pendant 1/4 d'heure. Les cultures de ferments du rouge seuls et en symbiose avec les Moisissures sont maintenues à 24°.

Les symbioses *Penicillium* + ferments du rouge, et *Penicillium* + *Oïdium* + ferments du rouge sont entièrement couvertes de Moisissure : le « rouge » n'a pas percé après plus d'un mois de culture.

Avec la symbiose *Oïdium* + ferments du rouge, un voile d'*Oïdium* recouvre le caillé dès le 2^e jour ; ce voile d'abord sec, devient glaireux après 24 jours de culture, et présente dès lors une teinte légèrement rosée. Le 37^e jour, les ferments du rouge envahissent toute la surface du caillé qui prend une teinte corail uniforme. Sur des cultures plus anciennes on observe un brunissement intense du pigment.

Avec la symbiose *Oïdium* + ferments lactiques seulement, la pigmentation rouge caractéristique des bactéries peut se manifester. L'*Oïdium* est donc d'une fa-

con constante l'intermédiaire obligé des ferments du rouge. Aussi lorsqu'un salage exagéré élimine l'*Oïdium* des fromages, le rouge ne peut se former.

L'*Oïdium* apparaît, dès lors, comme un agent indispensable à la maturation du Camembert.

Rôle de la peptone sur la formation du rouge

Au moment où le rouge apparaît dans la symbiose *Oïdium* + ferments du rouge, la solubilisation de la caséine est assez prononcée en surface. Il semblait donc que la présence de protéines dégradées devait activer et même provoquer la pigmentation rouge des ferments lactiques. Nous avons cherché à préciser le rôle de la peptone sur la pigmentation des ferments lactiques du rouge.

A du lait et à du caillé provenant de la coagulation du lait à la présure, on ajoute 2 % de peptone. Au cours de la stérilisation à 115° pendant 1/4 d'heure, le lait peptoné a coagulé.

FERMENTS LACTIQUES : ils forment dès le 7^e jour, un léger voile rosé à la surface du lait caillé peptoné. Cette coloration est plus ou moins persistante. La peptonisation de la caséine est des plus nettes ; les grumeaux perdent leur contour irrégulier ; les grains se soudent les uns aux autres en une masse compacte et homogène. Le lait caillé, sans peptone, ne présente dans le même laps de temps aucune modification. Sur caillé peptoné on observe aussi une légère coloration. La peptone tend

donc à provoquer la pigmentation des ferments lactiques du rouge en culture pure.

SYMBIOSE *Oïdium* + FERMENTS DU ROUGE : les bactéries chromogènes s'étendent le 8^e jour sur le voile d'*Oïdium* ; sur le même milieu sans peptone, le rouge apparaît seulement le 24^e jour de culture. Sur caillé peptoné le rouge se forme avec une avance de 13 jours sur le caillé sans peptone. D'une façon constante la peptone accélère le développement superficiel des ferments du rouge dans la symbiose *Oïdium* + ferments du rouge.

SYMBIOSE *Oïdium* + *Penicillium* + FERMENTS DU ROUGE : Le caillé se couvre d'abord de *Penicillium* et d'*Oïdium*. Vers le 15^e jour les bactéries pigmentées en rouge s'étendent au-dessus du *Penicillium* ; la Moisissure disparaît peu à peu sous la gangue bactérienne. Le 24^e jour il ne subsiste que de rares îlots de *Penicillium*. Nous avons reproduit dans cette expérience les phases successives et apparentes de la fermentation des fromages. Les milieux sans peptone ne portent aucune trace de ferments du rouge chromogènes.

La peptone favorise la pigmentation des ferments du rouge en culture pure. Elle accélère aussi le développement superficiel des ferments chromogènes dans les symbioses *Oïdium* + ferments du rouge et *Penicillium* + *Oïdium* + ferments du rouge. De plus en présence de peptone les caractères protéolytiques des cultures pures de ferments lactiques du rouge sont des plus nets.

Bien que nous visions uniquement à reproduire en quelque sorte synthétiquement la pigmentation des

ferments lactiques, nos résultats nous ramènent aux conclusions de Gorini [51] ; il montre, en effet, que l'addition au lait, de bouillon, d'eau de levure, de peptone, de sang défibriné exerce une activité stimulante sur les activités caillantes et caséolytiques des ferments lactiques. L'action stimulante de ces substances serait pour lui de nature catalytique. Vojkiewicz [142] voit plutôt dans les protéines ainsi ajoutées des tampons, qui diminuent dans le milieu la concentration des ions H^+ . Quel que soit le mécanisme, la peptone accélère la protéolyse et la pigmentation des ferments lactiques. Sur les fromages, la caséine dégradée par les Moisissures semble précisément jouer le même rôle que la peptone.

La dégradation de la caséine par les organismes seuls et par les symbioses

La dégradation de la caséine est souvent différente avec les organismes en culture pure ou en symbiose : Virtanem [141] Mazé [101], Grimmer [57] en donnent quelques exemples.

Golding [46] signale que certains ferments lactiques des fromages à pâte bleue influencent le développement du *Penicillium Roqueforti* ; ils modifient parallèlement le clivage de la caséine ; de là l'importance du choix des levains lactiques dans la fabrication des fromages à pâte bleue.

Nous avons cherché à établir les différences résultant de l'attaque de la caséine par les Moisissures et les ferments lactiques en culture pure, ou en symbiose.

Milieux. — Du lait titrant 22° Dornic a été additionné soit de présure, soit de 8 % d'acide lactique N/10. On conserve telle quelle une partie de ces laits. A d'autres portions de ces laits emprésurés ou acidifiés, on ajoute 2 % de peptone, ou 2,5 % de sel + 2 % de peptone. On coagule au bain-marie tous les laits emprésurés. Les laits acidifiés coagulent au cours de la stérilisation à

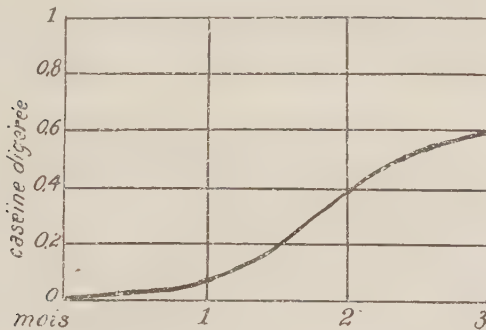


FIG. 9. — Courbe approximative de la solubilisation du caillé peptoné salé par les ferments lactiques du rouge.

115° (durée 1/4 d'heure). La caséine forme un bloc surmontant le petit lait rassemblée au fond des tubes. Les cultures sont maintenues à la température ordinaire.

La peptonisation de la caséine est très différente avec les deux Moisissures ; l'*Oïdium* solubilise la caséine en surface ; après un mois de culture le caillé est liquéfié sur 1 cm. de profondeur. Le *Penicillium* modifie, certes, la caséine en surface, mais la solubilisation s'opère toujours en profondeur ; la liquéfaction débute à la base des tubes.

La peptonisation du caillé par les ferments lactiques en culture pure est très lente ; Gorini [51] a montré combien même parfois il était difficile de mettre en évidence les propriétés protéolytiques des ferments. Dans nos cultures le bloc de caséine se désagrège peu à peu au contact du petit lait. Celui-ci se trouble d'abord puis devient franchement lactescent ; il s'épaissit ensuite progressivement au fur et à mesure que la caséine se dissout. Après 3 mois de culture le caillé acide + peptone et le caillé présure + peptone + sel sont nettement attaqués.

La caséine a été plus rapidement désagrégée avec le caillé acide + peptone + sel où les 3/5 du caillé sont passés en solution après 3 mois de culture (Fig. 9).

Toutes les symbioses de Moisissures et de ferments lactiques accélèrent de façon très marquée la peptonisation de la caséine. Ces faits semblent devoir être rapprochés de l'activité particulière des réductases provenant d'associations symbiotiques.

Les ferments lactiques du rouge favorisent dans la symbiose *Penicillium* + *Oïdium* + ferments du rouge, le développement du *Penicillium* ; la peptonisation en masse de la caséine est ainsi activée ; mais, la solubilisation *en surface* par l'*Oïdium* est entravée. Lorsque les Moisissures ont peptonifié le milieu, les ferments lactiques deviennent chromogènes ; parallèlement leurs propriétés protéolytiques sont exaltées. La fermentation lactique précédant le développement des Moisissures, paraît en grande partie diriger la peptonisation de la caséine autrement dit la maturation.

Les agents de la maturation du Camembert

La maturation du Camembert exige en résumé le développement simultané et mesuré de 3 symbiotes : *Penicillium*, *Oïdium*, ferments lactiques du rouge.

1° Le *Penicillium* est indispensable à la maturation. Il s'oppose à l'envahissement du caillé par l'*Oïdium* qui solubilise rapidement le caillé et l'alcalinise ; des bactéries alcalinisantes succèdent à l'*Oïdium*.

Le *Penicillium* en acidifiant le caillé favorise le développement des ferments lactiques du rouge qui communiquent à la pâte son bouquet caractéristique.

2° L'*Oïdium* prend également une part active à la maturation du Camembert. Il alcalinise le milieu et peptonifie la caséine ; il apparaît comme l'intermédiaire obligé des ferments du rouge qui n'acquièrent leur pigmentation caractéristique qu'en symbiose avec lui.

D'après Eckles, Rahn [37-38] et Marchal [98] ces mêmes propriétés feraient de l'*Oïdium* un agent de maturation des fromages de Harz, Hervé et Cassette. Il y aurait donc lieu de voir, jusqu'à un certain point, une analogie entre la maturation de ces fromages et celle du Camembert.

3° La maturation du Camembert ne commence qu'avec le développement superficiel des ferments de rouge ; ces bactéries suffisent à elles seules à provoquer le bouquet ; mais, une condition est indispensable : la présence de peptone dans le milieu. Nous avons vu précisément que les Moisissures (*Penicillium* et *Oïdium*) peptonifient la caséine.

Ni l'*Oïdium*, ni le *Penicillium*, ni les ferments du rouge séparés, ne peuvent assurer au fromage la texture et le bouquet du Camembert, non plus que la symbiose du *Penicillium* et des ferments lactiques (Dvorak [71]).

La maturation du Camembert est l'œuvre d'une symbiose composée des trois organismes.

Une maturation toujours uniforme et normale exigerait en conséquence un équilibre très strict dans l'activité réciproque des trois symbiotes. Cet équilibre en réalité est difficile à obtenir dans la pratique, la composition variable du caillé favorisant tantôt l'un tantôt l'autre des symbiotes, ce qui confère aux fabrications un caractère irrégulier.

Rapports entre la fabrication et la maturation

Le praticien s'efforce, en faisant varier sa technique de fabrication, d'obtenir une croûte moisie typique qui lui assure une bonne maturation.

Nous analyserons brièvement les rapports entre la fabrication et la maturation.

1° L'ACIDITÉ DU LAIT : elle favorise le développement de l'*Oïdium* : du caillé provenant de laits altérés,ensemencé avec la symbiose *Penicillium* + *Oïdium* + ferments du rouge se couvre uniquement d'*Oïdium* ; les ferments lactiques qui favorisent le développement du *Penicillium* sont très peu nombreux. Sur les fromages provenant de mauvais laits la croissance du *Penicillium* est compromise :

a) A cause de l'*Oïdium* qui prédomine.

b) Du fait d'un développement précaire des ferments lactiques du rouge ;

2° EGOUTTAGE : S'il est insuffisant l'*Oïdium* envahit le caillé et l'alcalinise ; des bactéries alcalinisantes lui succèdent. L'égouttage réglant la quantité de lactose qui reste dans la pâte limite la durée de l'acidification ; quand tout le lactose est attaqué le *Penicillium* et les ferments lactiques se joignent à l'*Oïdium* pour alcaliniser le caillé.

Par l'égouttage on modifie non seulement la composition de la flore, mais on règle aussi son activité.

3° SALAGE : L'*Oïdium*, en milieu modérément salé, est l'intermédiaire des ferments lactiques du rouge qui assurent au Camembert son arôme spécifique en milieu peptoné. Un salage exagéré élimine l'*Oïdium* et les ferments du rouge ; un salage insuffisant met le *Penicillium* dans l'impossibilité de se développer ; certaines diastases sont beaucoup moins actives en absence de sel.

Le salage sélectionne la flore et modifie ses propriétés.

4° TEMPÉRATURE : Elle règle aussi la composition de la flore : l'*Oïdium* supporte mal les basses températures auxquelles le *Penicillium* et les ferments lactiques du rouge peuvent proliférer.

La digestion de la caséine du Camembert est d'origine diastasique. Avec les symbioses, les diastases acquièrent une activité remarquable. Toute atteinte portée à la composition de la symbiose *Penicillium* + *Oïdium* + ferments lactiques du rouge et provenant d'une acidité,

d'un égouttage, d'un salage ou de températures peu appropriés, conduira à une maturation anormale. Aussi au cours de la fabrication faudrait il assigner une valeur fixe aux différentes opérations. De plus, dans la maturation des fromages à pâte molle, il y a lieu de tenir compte des affinités réciproques entre les Moisissures et les bactéries. Le développement des bactéries est sous la dépendance des Moisissures : l'*Oïdium* en alcalinisant le caillé prépare toujours le terrain au développement superficiel des bactéries ; le *Penicillium* au contraire s'y oppose. La composition et le développement de la flore fongique sont d'autre part conditionnés par la nature de la flore bactérienne ; c'est ainsi que la présence de bactéries du défaut de salage (alcalinisantes) rend très précaire le développement du *Penicillium* ; par contre dans la symbiose *Penicillium* + *Oïdium* + ferments lactiques, les ferments du rouge favorisent nettement la croissance du *Penicillium*.

L'activité des ferments lactiques sur les Moisissures n'est donc pas sans intérêt ; elle assure une certaine uniformité à la symbiose *Penicillium* + *Oïdium* + ferments lactiques, qui seule peut déterminer la maturation du Camembert.

CONCLUSIONS

1. Les fromages normaux couverts de *Penicillium*, d'*Oïdium* et de ferments du rouge sont acides : $\text{pH} = 6,5$.

Les fromages insuffisamment salés, envahis par l'*Oïdium* et des bactéries sont alcalins : $\text{pH} = 8,6$.

2. Sur des Camemberts de choix nous avons isolé :

1° Un *Penicillium* qui doit être rapporté au *Penicillium candidum* var. Rogeri ;

2° Un *Oïdium* présentant les caractères de l'*Oïdium lactis* (Fres.) ;

3° Des ferments du rouge, caractérisés par leur arôme spécifique de Camembert en milieu peptoné ; il sont très résistants à l'acidité et se rattachent au groupe des ferments lactiques acidoprotéolytiques de GORINI.

3. Le *Penicillium* est très résistant au sel (20 %). Au-delà de 6 % de NaCl l'*Oïdium* et les ferments du rouge ne peuvent se développer ; sur un fromage trop salé ces deux organismes seront éliminés.

4. L'*Oïdium* résiste à de plus fortes acidités que le *Penicillium* (*Oïdium* ; résistance 14 % en volume d'acide

lactique 5 fois normal; *Penicillium*: résistance 4 % d'acide lactique, 5 fois normal). Les deux Moisissures ont la même résistance à l'égard des milieux alcalins (4 % en volume, de soude 5 fois normale). Les ferments lactiques supportent 10 % d'acide lactique normal et peuvent proliférer sur bouillon à $\text{pH} = 4, 5$.

Sur le caillé acide au sortir du moule, le *Penicillium*, l'*Oïdium* et les ferments lactiques du rouge peuvent donc se développer simultanément.

5. Les basses températures (+ 4°) gênent moyennement le *Penicillium* et les ferments lactiques; elles ne conviennent pas à l'*Oïdium*.

6. Les ferments lactiques du rouge accélèrent le développement du *Penicillium* dans la symbiose *Penicillium* + *Oïdium* + ferments lactiques; leur présence a le même effet que le salage. Les bactéries des fromages mal salés compromettent par contre le développement du *Penicillium*.

7. Les ferments lactiques acidifient très lentement les milieux lactosés. Le *Penicillium* les acidifie d'abord, puis les alcalinise quand tout le sucre a été consommé. L'*Oïdium*, par contre, est un alcalinisant énergique des milieux sucrés. Les fromages bien salés sont acides à cause de la prédominance du *Penicillium* et des ferments lactiques sur milieu sucré. Les bactéries alcalinisantes se joignent à l'*Oïdium* pour alcaliniser très rapidement les fromages insuffisamment salés. Les Moisissures et

les ferments lactiques alcalinisent immédiatement les milieux sans sucre.

8. Le *Penicillium*, l'*Oïdium* et les ferments lactiques sécrètent des ferments réducteurs. La réduction du bleu de méthylène est d'autant plus rapide avec les ferments lactiques que le sucre offert est plus facilement attaqué.

La réaction alcaline et le sel, bien que limitant le développement du *Penicillium*, augmentent de beaucoup l'activité des réductases.

9. La peptonification de la caséine s'opère en surface avec l'*Oïdium*, et surtout en profondeur avec le *Penicillium*; elle est lente avec les ferments lactiques du rouge, et très rapide avec les symbioses.

En symbiose avec l'*Oïdium* seulement, les ferments lactiques du rouge acquièrent leur pigmentation caractéristique et succèdent au *Penicillium*. L'*Oïdium* est l'intermédiaire obligé des ferments du rouge.

La peptone favorise la pigmentation et les propriétés protéolytiques des ferments lactiques du rouge; ils succèdent aussi beaucoup plus rapidement aux Moisissures. Dans les fromages, la caséine digérée par les Moisissures semble précisément jouer le même rôle que la peptone.

10. En acidifiant le caillé le *Penicillium* protège les ferments lactiques du rouge (résistant à l'acidité et au sel), qui à leur tour favorisent le développement de la Moisissure.

L'*Oïdium*, qui alcalinise le caillé, cède la place à d'au-

tres bactéries : ce sont des bactéries de la putréfaction (alcalinisantes) qui lui succèdent sur le caillé sans sel, ou au contraire, sur caillé salé, les ferments lactiques du rouge qui communiquent à la pâte son arôme spécifique.

11. La symbiose *Penicillium* + *Oïdium* + ferments du rouge peut seule assurer la maturation régulière du Camembert ; elle s'oppose à la solubilisation rapide de la caséine par l'*Oïdium*.

12. Il y aurait lieu dans la pratique de tenir compte des affinités réciproques entre les Moisissures et les bactéries. Il conviendrait aussi d'attribuer à l'acidité, à l'égouttage, au salage et à la température une valeur fixe ; la composition de la symbiose *Penicillium* + *Oïdium* + ferments du rouge serait ainsi constante et la maturation y gagnerait en régularité.

Vu, bon à imprimer

Le Président de la thèse,

RADAIS

Le Doyen

RADAIS

Vu et permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

CHARLÉTY.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

1. ARTHAUD-BERTHET (J.). — Sur l'*Oëdium lactis* et la maturation de la crème et des fromages (*C. R. Ac. Sc.*, CXL, p. 1475, 1905).
2. BABCOCK (S. M.) et RUSSEL (H. L.). — Maturation des fromages (*Rev. gen. Lait*, I, p. 280, 1902).
3. BABCOCK (S. M.), RUSSEL (H. L.), VIVIAN (A.) et HASTINGS (E. G.). — De l'influence du sucre sur la nature des fermentations du lait et des fromages (*Rev. gen. Lait*, XV, p. 305, 1901).
4. BACH (D.). — Contribution à l'étude de la nutrition azotée de l'*Aspergillus repens* de BARY (*Thès. Fac. Sc.*, Paris, Brulliard, St-Dizier, 1925).
5. BACHRACH (E.) et CARDOT (H.). — Sur la possibilité de déplacer l'optimum thermique d'un ferment figuré (*C. R. Soc. Bio.*, VC, p. 962, 1926).
6. BAINIER (G.). — *Penicillium caseicolum* (*Bul. Soc. Myc. Fr.*, XXIII, p. 94, 1907).
7. BARTHEL (C.). — Influence des Moisissures sur les ferments lactiques (*Le Lait*, IV, p. 725, 1924).
8. BOSWORTH (A.). — Chemical studies of Camembert cheese (*N. York Agric. Exp. Stat.*, Technical Bul 5. Geneva, 1907).
9. BEAU (M.). — Le pays d'Auge et l'industrie fromagère normande (*L'Ind. lait.*, XXXIII, p. 631, 1908).
10. BEAU (M.) et BOURGAIN (C.). — *L'industrie fromagère*, 2 vol., Baillière, Paris 1926.

11. BELLET (A.). — Nouvelle méthode de dosage de l'acid lactique (*Bul. Soc. Chim. Fr.*, XIII, p. 363, 1913).
12. BERBERICH (J. M.). — Kamembert Fabrikation (*Molk. Zeit.*, XXII, p. 11, 1908).
13. BERTRAND (G.) et DUCHACEK (F.). — Action du ferment bulgare sur les principaux sucres (*An. Ins. Pasteur*, XXIII, p. 402, 1909).
14. BESANA (C.) et SAMARANI (F.). — Méthode de fabrication rationnelle du fromage de Grana (Parmesan) avec des ferments sélectionnés (*Rev. gen. lait.*, IX, p. 337, 1913).
15. BEZANÇON (F.). — *Précis de microbiologie*, p. 387, Masson, 1920).
16. BOURGE (P.). — Les Moisissures du genre *Penicillium* LINK : Etude monographique (*La Cellule*, XXXIII, p. 1, 1923).
17. BUDINOW (L.). — Zur Physiologie des *Bacterium lactis acidii* (*Centralb. f. Bak.*, XXXII, p. 177, 1912).
18. BURR (A.). — Camembert Käse (*Molk. und Kaser. Zeits.*, III, p. 21, 1909).
19. BUTTENBERG (P.) et GUTH (W.). — Ueber Camembert Käse (*Zeit. f. Unters. der. Nahr. u. Genuss*, Band 14, Heft. II, p. 677, Berlin 1907).
20. CARDOT (H.) et LAUGIER (H.). — Action de fortes concentrations salines sur le bacille lactique (*C. R. Soc. Bio.*, LXXXVI, p. 108, 1922).
21. CHODAT (R.) et HOFMANN BANG (N.). — Etude de divers ferments lactiques (*Ann. Inst. Pasteur.*, XV, p. 36, 1901).
22. CLARK (M.). — The determination of Hydrogen ions. (Second Edition, Baltimore, 1922)
23. CLAYTON (W.). — L'emploi et les effets du sel dans le beurre et la margarine (*Le Lait*, VII, p. 913, 1927).
24. COMBES (A.). — Causes de l'insuffisance de l'égouttage dans les fromages à pâte molle et dans les fromages à pâte ferme, non soumis à la pression (*La Laiterie*, XI, p. 3 et 12, 1922).
25. CONN (H.), THOM (C.), BOSWORTH (A.), STOCKING (W.) et

ISAJEFF (T.). — The Camembert type of soft cheese in the U. States (*U. S. Depart. of Agric. Bur. Anim. Ind.*, Bull. 71, p. 29, Washington, 1903).

26. CONN (H.), ESTEN (W.) et STOCKING (W.). — Classification of dairy bacteria (*Report of the Storrs (Connecticut) Agric. Exp. Station*, for 1906).

27. CONSTANTIN (J.) et RAY (J.). — Sur les champignons du fromage de Brie (*C. R. Soc. Bio.*, V, p. 304, 1898).

28. CORNALBA (G.). — Sul chimismo della maturazione dei formaggi a pasta molle (*L'Ind. lattiera e zoot.*, XXXII, p. 7 et 16, 1907).

29. DAIRE (P.). — Les microbes dans l'industrie laitière, Baillière, 1914.

30. DENIGÈS (G.). — *Précis de Chimie analytique*, p. 747, Maloine, Paris 1913.

31. DOANE (C.) et LAWSON (H.). — Varieties of cheese, descriptions and analyses (*U. S. Dep. of Agric. Bur. Anim. Ind.*, Bul. 103, Washington, 1908).

32. DOMBROWSKI (W.). — Die Hefe in Milch und Milchprodukten (*Central. f. Bakt.*, II, XXVIII, p. 12, 1910).

33. DOX (A.). — Proteolytic changes in the ripening of Camembert (*U. S. Dep. of Agric. Bur. of Anim. Ind.*, Bull. 109, Wash., 1908).

34. DUCLAUX (E.). — Principes de laiterie, Paris, 1893.

35. DUCLAUX (E.). — Chimie Biologique, Paris 1883.

36. DUCLAUX (E.). -- 3^e Mémoire sur le lait (*An. Inst. Agro.*, IX p. 13, 1884).

37. ECKLES (C.). — Recherches sur les fromages faits avec du lait caillé sans présure (Sauermilchhäse) (*Rev. gen. Lait*, V, p. 9, 1903).

38. ECKLES (C.) et RAHN (O.). — Die Reifung der Harzkäse (*Central. f. Bakt.*, II, XIV, p. 676, 1903).

39. EFFRONT (E.). — Action du ferment bulgare sur les substances protéiques et amidées (*C. R. Ac. Sc.*, CLI, p. 1007, 1910).

40. EPSTEIN (S.). — Untersuchungen über die Reifung von Weichkäsen (*Arch. f. Hyg.*, XLIII, p. 1, XLV, p. 334, Munich et Leipzig, 1902).

41. FALES (H.) et NELSON (J.). — Effets du chlorure de sodium sur l'action de l'invertase (*Journ. Am. chem. Soc.*, XXXVII, p. 2769, 1915).

42. FETTICK (O.). — Quantitative und qualitative Untersuchungen über die Bakterien, Hefen und Pilze der Butter und über den Einfluss des Kochsalzes auf dieselben. Welcher Kochsalzgehalt ist für Dänen oder Exportbutter Zülässig (*Abdruck aus den Central.*, XXII, 1908).

43. FLEURY (P.). — Rapport entre l'activité diastasique et la réaction du milieu (*Bull. Soc. chim. Bio.*, VI, p. 536, 1924).

44. FREUDENREICH (E. DE). — Actions différentes des ferments lactiques sur la maturation du fromage (*Central. f. Bakt.*, II, XIV, p. 34, 1905).

45. FREUDENREICH (E. DE). — Sur quelques expériences faites sur le tyrogène (*Rev. Gen. du Lait*, I, p. 78, 104, 1901).

46. GOLDING (N.). — Quelques facteurs affectant le développement de certaines espèces de *Penicillium Roqueforti* (*Journ. of Dairy Sc.*, IX, p. 28 et 236, 1926).

47. GORINI (C.). — Recherches sur les Coccus producteurs d'acide et de présure (*Rev. gen. Lait*, VIII, p. 337, 1910).

48. GORINI (C.). — Ma théorie acidoprotéolytique sur la maturation des fromages (*Le Lait*, VII, p. 36, 1927).

49. GORINI (C.). — Sur la manière de se comporter des bactéries productrices d'acide et de présure (acidoprotéolytiques) du fromage, vis-à-vis des températures basses, et leur intervention dans la maturation des fromages (*Rev. gen. du Lait*, IX, p. 97, 1912).

50. GORINI (C.). — Production rationnelle du Parmesan (*Central. f. Bakt.*, II, XXXVI, p. 42, 1912).

51. GORINI (C.). — L'action et la stimulation des streptocoques dans le lait (*Le Lait*, VII, p. 225, 1927).

52. Goy (P.). — Action du filtrat de *Mucor* sur le développement des cultures microbiennes (*C. R. Soc. Bio.*, LXXXVI, p. 1007, 1922).

53. GRATZ (O.). — Studien über die Antibiose zwischen *Bacterium casei* Σ , und den Bakterien *Coli* *Aerogenes* Gruppe (*Zeit. f. Garun. Phys.*, I, p. 256, 1912).

54. GRATZ (O.) et SAINT SZANYI. — Beteiligungen sich bei den Hartkäsen die Enzyme der Rindenflora an dem Käsestoff und Feltspaltung der Kaseinnern ? (*Bioch. Zeit.*, LXIII, p. 436, 1914).

55. GRIMBERT (L.). — Diagnostic des bactéries par leurs fonctions biochimiques (*Thès. Fac. Méd.*, De Rudeval, Paris 1903).

56. GRIMM (M.). — Die Hauptphasen der Milchsäuregärung und ihre praktische Bedeutung (*Central. f. Bak.*, II, XXXII, p. 63, 1911).

57. GRIMMER (W.), BODSCHWINA (W.) et LIGNAU (E.). — Contribution à la biochimie de l'*Oidium lactis* (*Milchwirtsch. Forsch.*, I, p. 374, 1924).

58. GRIMMER (W.) et STEINLECHNER (E.). — Contribution à la biochimie de l'*Oidium lactis*. *Ibid.*, II, p. 122, 1926.

59. GUÉRAULT (P.). — De la fabrication du fromage avec du lait pasteurisé (*L'Ind. Laitière*, XVII, p. 332, 1909).

60. GUÉRAULT (P.). — Etude sur la fabrication actuelle des fromages à pâte molle (Brie, Coulommiers, Camembert). La nécessité de la conduire d'après des données scientifiques (*2^e Congrès d'Industrie laitière*, Paris, 1905).

61. GUITTONNEAU (G.). — Les principes d'une technique rationnelle en Industrie Laitière. Rôle des microorganismes en laiterie (*Le Lait*, Lyon, 1923).

62. GUITTONNEAU (G.). — Sur le rôle de la présure et son mode d'action dans la fabrication des fromages à pâte cuite (Gruyère, Emmenthal) (*C. R. Ac. Sc.*, CLXXX, p. 1536, 1925).

63. GUITTONNEAU (G.), KELLING (J.) et BARRET (J.). — Les

présures commerciales dans la fabrication des fromages à pâte cuite (*Le Lait*, VI, p. 170, 1926).

64. HAGLUND (E.), BARTHEL (C.) et SANDBERG (E.). — La teneur en organismes du lait destiné à la fromagerie et la maturation (*Het Algemeen, Zuivel en Melkhygien. Weekb.*, XX, p. 26, 1924).

65. HAHN (A.) et MICHALIK (R.). — Influence des sels neutres sur les diastases (*Z. f. Biol.*, LXXIII, p. 10, 1921).

66. HASTINGS (E.) et HART (E.). — The presence of an acid producing enzyme in *Bact. lactis acidii* (*Procee. of Soc. of biol. Chem.*, in *Jour. of biol. Chem.*, XXXVIII, p. 14, 1913).

67. HOCHSTRASSER (W.) et PRICE (W.). — La fabrication du Camembert à partir du lait stérilisé (*Milch. Forsch.*, V. p. 30, 1927).

68. HUCKER (J.). — Revue des aspects bactériologiques de la maturation (*N. York. Agric. Exp. Sta.*, Techn. Bul. 89, 1922).

69. HUCKER (G.) et MARQUARDT (J.). — Effets de certains producteurs d'acide lactique sur l'arôme du fromage de Cheddar (*Le Lait*, VI, p. 843, 1926).

70. ISAJEFF (T. W.). — Investigations in the manufacture and curing of cheese. Directions for making Camembert type of cheese (*U. S. Dep. of Agric. Bur. of anim. Ind.*, Bul. 98. Washington 1907).

71. JAROSLAW-DVORAK. — Etudes chimiques sur quelques Moisissures du genre *Penicillium* dans les fromageries (an. in *Le Lait*, VI, p. 361, 1921).

72. JAROSLAW-DVORAK. — Quelques remarques sur l'étude de BARTHEL : Influence des Moisissures sur les ferments lactiques (*Le Lait*, V, p. 277, 1925).

73. JAVILLIER (M.) et TCHERNOROUTZKI (M.). — Influence comparative du zinc, cadmium et du glucinium sur la croissance de quelques Hyphomycètes (*Penicillium...*), (*C. R. Ac. Sc.*, CLVII, p. 1.173, 1913).

74. JENSEN (O.). — Etude sur les acides gras volatils du

fromage et contribution à la biologie des ferments lactiques (*Ann. Agric. Suisse*, V, p. 229, 1904).

75. JENSEN (O.). — Chemische Untersuchungen über die Gerinnung der Milch und über die Löslichkeit des Gerinnsels in Salzwasser (*Zeits. f. phys. Chem.*, XCIII, p. 283, 1914).

76. JÉRUSALEM (E.). — Un nouveau dosage de l'acide lactique dans les organes et les liquides animaux (*Bioch. Zeit.*, III, p. 378, 1908).

77. KAYSER (E.). — Contribution à l'étude de la fermentation lactique (*Thès. Fac. Sc.*, Paris. Charaire C^{ie}, Sceaux, 1894).

78. KAYSER (E.). — Influence de la matière azotée sur la production d'acétate d'éthyle dans la fermentation alcoolique (*C. R. Ac. Sc.*, CLV, p. 185, 1912).

79. KAYSER (E.). — Microbiologie. Baillièrè, Paris 1921.

80. KLEIN (J.) et KIRSTEN (A.). — Influence de divers sels sur les bactéries des fromages (*Rev. gen. Lait*, p. 19, 1901).

81. KLEINBOIL (M.). — Sur le fromage de Camembert (*Molkerei. Zeit. (Hildesheim)*, XXXI, p. 2, 1922).

82. KLINCKSIECK (P.) et VALETTE (T.). — Code des Couleurs Klincksieck, Paris, 1908.

83. KONDO (K.). — Ein experimenteller Beitrag zur Frage der Fettbildung aus Eiweiss bei der Reifung des Käses (*Bioch. Zeit.*, LIX, p. 113, 1914).

84. KOSTYTCHÉW (S.) et AFANASIEWA (A.). — Sur la respiration des microbes de la fermentation lactique (*C. R. Ac. Sc.*, CLXXXI, p. 161, 1925).

85. LANG (M.) et FREUDENREICH (E. von). — Ueber *Oidium lactis* (*Landwirt. Jahr, der Schw.*, VII, p. 229, 1893).

86. LANGLAIS (M.). — Contribution à l'étude de la flore fromagère (*Thès. Fac. Pharm.*, Paris, Salmon, Tours 1911).

87. LAXA (O.). — L'examen microscopique des fromages, (an. in *Le Lait*, VI, p. 885, 1926).

88. LINDET (L.), AMMAN (L.) et HOUBET (V.). — Sur la maturation des fromages (*Ann. Inst. Agro.*, III, p. 223, 1904).

89. LINDET (L.). — Sur le rôle antiseptique du sel marin et du sucre (*C. R. Ac. Sc.*, CLV, p. 790, 1912).

90. LOUBIÈRE (A.). — Sur la flore fongique du fromage de Brie (*C. R. Ac. Sc.*, CLXX, p. 336, 1920).

91. LUMIÈRE (G.). — Contribution à l'étude de la fermentation lactique et des propriétés des microbes (*An. Ins. Pasteur*, XXXVII, p. 966, 1923).

92. LUTZ (L.) et GUÉGEN (F.). — De l'unification des méthodes de culture pour la détermination des Mucédinées et des Levures (*Cong. Int. de Bot.*, à l'Exposition Univ., Paris, 1900. Extr. Comptes Rendus, p. 413).

93. LUTZ (L.). — Sur les ferments solubles catalyseurs d'oxygène sécrétés par les Champignons Hyménomycètes (*Bul. Soc. Chim. Bio.*, X, p. 826, 1928).

94. MAHEU (J.). — Essais bactériologique et chimique des préparations pharmaceutiques dites « ferments lactiques » (*Thès. Fac. Méd.*, Paris. Lefrançois, Paris, 1921).

95. MAKRIKOFF (J.). — Ueber die Wirkung der Neutralisation von Nahrmedien mit Kreide auf die Activität von Milchsäurebakterien (*Central. f. Bakt.*, II, XXXVII, p. 609, 1913).

96. MARRE (F.). — Teneur en matière grasse des Camemberts et interprétation des mesures adoptées par les précédents Congrès (Paris-Genève) (*Ind. Laitière*, XVIII, p. 294, 1914).

97. MARCAS (L.) et HUYGE (O.). — Influence de la pepsine sur la maturation du fromage de Hervé (*Rev. gén. du Lait*, VI, p. 23, 1906).

98. MARCHAL (E.). — Contribution à l'étude des fromages mous (*Ann. Soc. Belge Microsc.*, XIX, p. 29, 1893).

99. MARSHALL (C.) et FERRAND (R.). — Bacterial association in the souring of milk (*Central f. Bakt.*, II, XXI, p. 7, 1908).

100. MAZÉ (P.). — I : La fabrication du Cantal et les moyens de réaliser la pureté de la fermentation lactique qui assure sa maturation normale ; II : La fabrication du Port-

Salut et des fromages de Hollande ; III : Les améliorations à réaliser dans la fabrication des fromages à pâte cuite (*C. R. Ac. Sc.*, CLXXVIII, p. 893, 1033, 729, 1924).

101. MAZÉ (P.). — Les microbes dans l'industrie fromagère (*An. Inst. Pasteur*, XIX, p. 378, 481, 1905).

102. MAZÉ (P.). — Technique fromagère (*Ibid*, XXIV, p. 395, 435, 543, 1910).

103. MAZÉ (P.). — L'influence de la température sur la fabrication, l'affinage et la conservation des fromages à pâte molle (*L'Ind. Laitière*, XXXII, p. 9, 1907).

104. MESNIL (M.). — Sur le salage des fromages à pâte molle (*L'Ind. Laitière*, XXXII, p. 187, 1907).

105. MESNIL (M.). — Sur l'inégalité d'acidité des deux faces d'un fromage (*Le Lait*, VII, p. 162, 1927).

106. MODSCEIM (J.). — Dosage de l'acide lactique en présence de matières protéiques (*Bioch. Zeit.*, XCII, p. 105, 1912).

107. MORIÈRE (J.). — L'industrie fromagère dans le Calvados, Le Blanc, Caen, 1887.

108. MURRAY (A.). — La préparation du fromage de Camembert (*Hansen's dairy bul.*, X, p. 7, 1923).

109. NEMEC (A.) et VACLAV, KAS. — Influence favorable du sélénium sur quelques Moisissures provenant de l'Industrie fromagère (*C. R. Ac. Sc.*, CLXXI, p. 746, 1920).

110. NIERSTEIN (M.). — The transformation of proteins into fats during the ripening of cheese (*Procee. Roy. Soc. Biol.*, XXXIII, p. 301, 1911).

111. NOTE DU SERVICE DE RÉPRESSION DES FRAUDES. — Sur une série de fromages mis en vente comme « fromages Camembert » et similaires, (*Ann. falsif. fraudes*, V, p. 187, 1912).

112. PASTEUR (L.). — Mémoire sur la fermentation appelée lactique (*Ann. chim. et phys.*, 3^e série, LII, 1862).

113. RICHET (C.). — De la non accoutumance héréditaire des microorganismes (ferments lactiques) aux milieux peu nutritifs (*C. R. Ac. Sc.*, CLVIII, p. 1749, 1914).

114. RICHET (C.). — Influence de la surface libre sur la marche de la fermentation lactique (*C. R. Soc. Bio.*, LVIII, p. 957, 1905).

115. RODELLA (A.). — Sur l'importance des bactéries anaérobies stricts de la putréfaction dans la maturation des fromages (*Central. f. Bakt.*, XVI, p. 52, 1906).

116. ROGER (G.). — La matière grasse dans les fromages à pâte molle (*II^e Cong. int. lait.*, Paris 1905).

117. ROGER (G.). — La fabrication du fromage de Brie. (*Rev. Hebdomadaire*, XI, p. 327, 1902).

118. ROGERS (L.). — Effet inhibiteur du *Str. lactis* sur le *lactobacillus bulgaricus* (*Jour. of bact.*, XIV, p. 26, 1928).

119. ROLET (A.). — Moyens de remédier aux défauts des fromages à pâte molle (*L'Ind. lait.*, XV, p. 29, 1905).

120. ROLET (A.). — Fabrication et composition de quelques fromages et du beurre (*Bul. Soc. enc. ind. nat.*, II, p. 91, 1901).

121. RULLMANN (W.). — Ueber Säurebildung durch *Oidium lactis*, (*Centr. f. Bakt.*, II, XVIII, p. 743, 1907).

122. SACCARDO (P.). — Intorno al *Oidium lactis* Fres (*Dagli atti della Societa Veneto Trentina di Scienze Naturali residente in Padova*, V, fasc. II, 1878).

123. SACCARDO (P.). — *Sylloge Fungorum*, IV, p. 15, 1866.

124. SANFELICI (F.). — Studio chimico sulla maturazione dei formaggi a pasta molle (*Stazioni sperimentali agrarie*, XLI, p. 1, 1908).

125. SARTORY (A.). — Peptonification du lait par certaines Moisissures (*C. R. Soc. Bio.*, LXIV, p. 789, 1908).

126. SCORODAUMORA (A.). — La flore du Camembert préparé en Russie (an. in *Le Lait*, IX, p. 61, 1929).

127. SMORODINZTEFF (J.) et ADOFF (A. N.). — Les tampons dans l'étude des protéases (influence sur le pH pendant la digestion de la caséine) (*Bul. Soc. Chim. Bio.*, VII, p. 1154, 1925).

128. SOBOLEWA (W.) et ZALESKI (J.). — Le dosage de l'aldé-

hyde acétique au moyen du pyrrol et l'emploi de cette méthode pour le dosage de l'acide lactique (*Zeits. phys. Chem.*, CXIX, p. 441, 1910).

129. SPEAKMANN (H.), GEE (A.) et LUCK (J.). — Influence of sodium chloride upon the growth and metabolism of yeasts (*Jour. of Bact.*, XV, p. 319, 1928).

130. SUZUKI (S.) et HART (E.). — The quantitative estimation of lactic acid in cheese (*Jour. of Am. Chem. Soc.*, XXXI, p. 1364, 1909).

131. THOM (C.). — Fungi in cheese ripening: Camembert and Roquefort (*U. S. Dep. of Agric. Bur. An. Ind.*, Bul 82, 1905).

132. THOM (C.). — The care and testing of Camembert cheese (*U. S. Dep. Agric. Bur. Anim. Ind.*, p. 339, 1907).

133. THOM (C.). — Camembert cheese problemes in U. States (*Connecticut Storrs. Sta.*, Bul 58, p. 317, 1910).

134. THOM (C.). — Cultural studies of species of *Penicillium* (*U. S. Dep. Agric. Bur. An. Ind.*, Bul. 118, p. 109, 1910).

135. THOM (C.). — Soft cheese studies in Europe. XXIIth annual (*Rep. of Bur. Anim. Ind.*, for year 1905, p. 79. Wash. 1907).

136. THOM (C.). — Salt factor in the mold ripening cheese (*Connecticut Storrs. Sta.*, Bul 97, p. 387, 1914).

137. TROILI PETERSON (G.). — Studien über saure Milch und Zähmilch (*Zeit. f. Hyg.*, XXXII, p. 361, 1899).

138. VAN DAM (W.). — Recherches sur le processus de maturation du fromage d'Edam (*Rev. gen. Lait*, VIII, p. 73, 97, 1910).

139. VAN SLYKE, HARDING et HART. — A study of enzyme in cheese, Bul. 203 (*Agric. Exp. Sta. Geneva*), N. York, an in *Rev. gen. lait*, I, p. 330, 1902).

140. VASLIN (P.). — Le salage des Camemberts en bain de saumure (*Le Lait*, V, p. 113, 1925).

141. VIRTANEM (A.). — Sur la dégradation de la caséine

par les *bact. casei* et les *lactocoques* (*Soc. Scientiar. Fennica Commentationes physic. matemat.*, LXI, p. 13, 1923).

142. VOJKIEWICZ (A.). — Sur la physiologie des bactéries lactiques (*Bul. stat. agro. bact. de Moscou*, XXIV, p. 113, 1926).

143. WEIDEMANN (C.). — Morphologische Beschreibung einiger *Penicillium*-Arten (*Penicillium camemberti*, THOM, *Central. f. Bakt.*, II, XIX, p. 738, 1907).

144. WOLF (W.) et BERBERICH (F.). — Der Einfluss des Salpeters auf die Qualität des Käses (*Molk. Zeit.*, XXII, p. 52, 1908).

1930. Saint-Amand (Cher). — Imprimerie A. CLERC.
